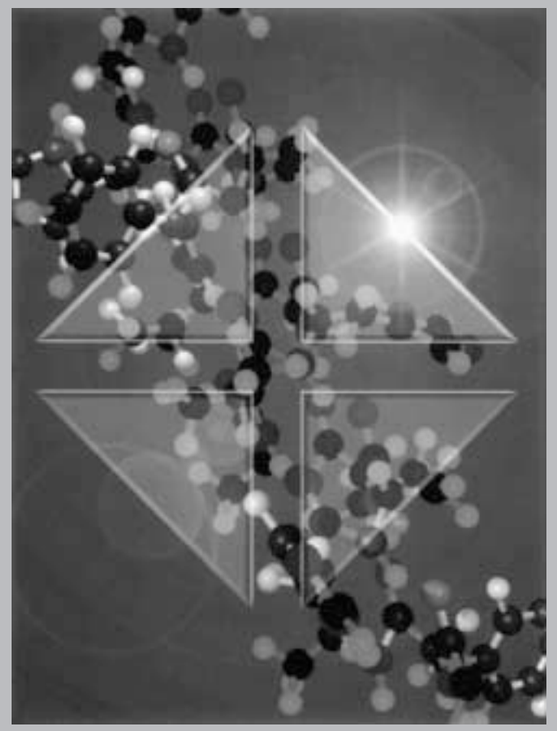
Amersham Biosciences

ÄKTA*design*

# ÄKTA*explorer*



## 簡易マニュアル
## （UNICORN ver. 4.1版）

Amersham
Biosciences

71-1190-35

# 目次


1. はじめに.....5
1.1 ÄKTAexplorer の構成.....5
2. 起動.....10
2.1 UNICORNの起動.....10
2.2 画面操作.....11
2.2.1 ツールバー、タスクバー.....11
2.2.2 画面操作.....12
2.3 ユーザー登録.....13
3. システム準備.....16
3.1 廃液チューブ.....16
3.2 リンス液のチェック.....16
3.3 ポンプのパージ（エアー抜き）.....16
3.4 圧力の安定性チェック.....17
4. システム洗浄.....19
4.1 ポンプ洗浄.....19
4.2 システム洗浄.....19
4.3 サンプルポンプ洗浄.....19
5. カラムの接続.....20
5.1 カラムの配管.....20
・FPLC用カラム.....20
・ÄKTA用カラム（他社カラム）.....20
・HiTrapカラム.....20
・HiPrepカラム.....20
5.2 カラム接続.....21
5.3 カラムの準備.....21
6. 溶液交換.....23
6.1 溶液交換.....23
6.2 ポンプの確認.....23
7. サンプル添加の準備.....24
7.1 マニュアルサンプル充填.....24
7.2 SamplePump P-950.....24
7.3 サンプルループへの自動サンプル充填（標準配管）.....25
7.3.1 配管.....25
7.3.2 サンプルの準備.....26
7.4 スーパーループへの自動サンプル充填.....27
7.4.1 配管.....27
7.4.2 スーパーループの接続と準備.....28
7.4.3 パージ操作.....28
7.4.4 サンプルの準備.....29
7.5 カラムへのサンプル直接添加.....29
7.5.1 配管.....29
7.5.2 パージ操作.....30
7.5.3 サンプルの準備.....34
7.6 P-950のマニュアルパージ法.....34
8. フラクションコレクターの準備.....36
8.1 Frac-950の場合.....36
8.1.1 チューブホルダーの変更と設置.....36

8.1.2　配管 ....37
8.1.3　ラックの選択 ....38
8.1.4　DropSyncro/Accumulatorの変更・選択 ....39
8.2　Frac-900の場合 ....40

**9.　メソッドの作成 ....42**
9.1　ウィザード形式でのメソッド作成 ....42
9.2　作成したメソッドのテンプレートとして保存 ....52

**10.　メソッド作成例 ....53**
10.1　ゲルろ過（マニュアルサンプル添加） ....53
10.2　イオン交換（サンプルループへの自動サンプル充填） ....56
10.3　イオン交換（カラムへのサンプル直接添加） ....60

**11.　メソッド作成（応用） ....64**
11.1　BufferPrep機能 ....64
11.2　スカウティング機能 ....65
11.2.1　pHスカウティングのプログラミング例 ....65
11.2.2　最適なカラムを選択するスカウティング例 ....71
11.2.3　至適分離条件を探すメソッドスカウティング例 ....76
11.2.4　サンプル添加量のメソッドスカウティング例 ....81

**12.　メソッドの実行 ....86**
12.1　サンプル準備 ....86
12.1.1　マニュアルサンプル充填 ....86
・完全充填 ....86
・一部充填 ....86
12.1.2　サンプルポンプ自動添加 ....87
12.2　フラクションコレクターの確認 ....87
12.3　pH電極準備 ....88
12.4　メソッド実行 ....89

**13.　実行中の画面表示 ....90**
13.1　ウィンドウの選択 ....90
13.2　ウインドウ表示 ....90
13.2.1　Run data ....90
13.2.2　Curves ....91
・カーソルの表示 ....92
・カーブの色と線種の変更 ....92
・Y軸のスケールの変更 ....93
・X軸のスケールの変更 ....93
・ズーム ....94
13.2.3　フロースキーム（流路図） ....94
13.2.4　Logbook ....94
13.3　マニュアル操作 ....95
13.3.1　ツールバー ....95
13.3.2　マニュアル命令 ....95
13.3.3　強制終了 ....95

**14.　データ処理（Evaluation） ....96**
14.1　データの呼び出し ....96
14.2　画面表示 ....96
14.2.1　カーブの選択 ....97
14.2.2　軸の設定 ....97
・Y軸 ....97
・X軸 ....98



14.2.3　カーブの色、線種の変更 ....98
14.2.4　インフォーメーションの表示 ....99
14.2.5　レイアウトの保存 ....99
14.2.6　ズームアップ ....100
14.2.7　他のクロマトグラムとの比較 ....100
・検索してクロマトグラムを一括で表示する場合 ....100
・クロマトグラムを一つずつ選択する場合 ....101
14.2.8　複数のクロマトグラムの画面表示 ....101
14.2.9　カーブの比較 ....102
・検索して一括でカーブを表示する場合 ....102
・表示されたウィンドウにカーブを呼び出す場合 ....104
・表示したカーブを同じスケールで表示する場合 ....105
14.2.10　リテンションタイムとピーク高さの測定 ....105
14.2.11　クロマトグラムのテキスト入力 ....106
・テキストの入力 ....106
・テキストの変更・削除 ....106
14.3　クロマトグラムのプリントアウト ....106
・レイアウト変更の例（1枚に複数のクロマトグラムをプリントする） ....107
14.4　レポート機能を使う ....108
14.4.1　既存レポートフォーマットを使用する ....108
14.4.2　レポートのレイアウトの変更 ....108
14.4.3　レポートフォーマットの保存 ....109
14.5　Resultファイルに保存される文書 ....110
14.6　面積計算（Integrate） ....113
14.6.1　面積計算（Integrate） ....113
14.6.2　ピークテーブル表示 ....114
14.6.3　ピークラベルの変更 ....114
14.6.4　ピークの表示 ....115
14.6.5　Peak integrateの至適化 ....115
14.6.6　ベースラインのマニュアル編集 ....116
・ベースラインデータポイントの挿入 ....116
・ベースラインデータポイントの削除 ....117
・新しいベースラインの引き方 ....117
14.6.7　ピークリミットの調整 ....117
・ピークテーブルのピークの削除 ....118
・ピーク分離 ....118
・ピークの結合 ....118
・ピークスタートとエンドポイントの調整 ....118
・ピーク名表示 ....119
14.6.8　カラムの理論段（HETP） ....119
14.7　フラクションの塩濃度 ....119
14.8　ブランクランカーブの引き算 ....120
・ブランクランカーブの呼びだし ....120
・ブランクランカーブの引き算 ....121
14.9　ピークフラクショネーションのSlope値 ....121
14.10　結果のExport（テキストデータ出力） ....122
14.11　クロマトグラムをクリップボードにコピーする（画像データ出力） ....123
14.12　活性カーブの作成 ....123
14.13　ヒストグラムの作成 ....126

**15.　システム終了 ....128**
15.1　ポンプ洗浄 ....128
15.2　システム洗浄 ....128
15.3　サンプルポンプ洗浄 ....128

15.4　フラクションラインの洗浄 ....128
15.5　カラムの洗浄 ....129
15.6　pH電極の保存 ....129
15.7　システムの終了 ....130

16.　メンテナンス ....131
16.1　システムの保存 ....131
16.2　リンス液の交換 ....131
16.3　オンラインフィルター ....131
16.4　インレットフィルター ....131
16.5　フラクションコレクター ....132
16.6　インジェクションフィルポート ....132

17.　システム設定 ....133
17.1　ディレイボリューム確認 ....133
17.2　システムの耐圧設定 ....134
17.3　コンダクティビティモニターのCond%表示 ....134

18.　キャリブレーション ....135
18.1　圧力センサー ....135
18.2　pH電極キャリブレーション ....135

19.　ファイル管理（Main menu） ....137
19.1　新規フォルダーの作成 ....137
19.2　ファイルを開く、メソッドの実行 ....137
・ファイルを開く ....137
・メソッドの実行 ....137
19.3　ウィンドウ表示 ....138
・View mode ....138
・ファイルのソート ....138
・Filter ....139
19.4　ファイルの検索 ....139
19.5　フロッピーディスクのフォーマット ....140
19.6　データのバックアップ（Copy to external） ....141
19.7　バックアップしたデータをハードディスクにコピー（Copy from external） ....141
19.8　ファイルの削除 ....142
19.9　ファイル名の変更（Rename） ....142
19.10 プリンター設定 ....142

20.　応用 ....143
20.1　サンプルの添加 ....143
20.1.1　スーパーループによるサンプル添加 ....143
20.1.1.1　スーパーループ準備 ....144
20.1.1.2　スーパーループへのサンプルの充填 ....145
20.1.2　グラジエントポンプを用いた大量サンプルの添加 ....145
20.1.2.1　グラジエントポンプの準備 ....145
20.1.2.2　サンプル添加 ....146
20.1.2.3　グラジエントポンプの洗浄 ....146
20.2　カラムリストの追加 ....147
20.3　メソッドテンプレート ....148
20.3.1　Text Instructionエディターよりメソッドの変更 ....148
20.3.1.1　コマンドの追加 ....149
20.3.1.2　コマンドの変更 ....149
20.3.1.3　コマンドの削除 ....149

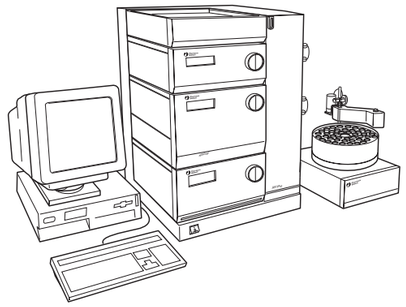


# 1. はじめに

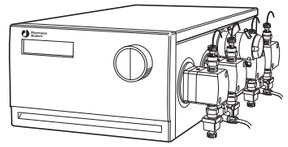
このマニュアルは、はじめてÄKTAexplorerをお使いになる方のために書かれたものです。基本的な使い方を中心に書かれています。応用操作はシステム付属のマニュアルを参照ください。

## 1.1　ÄKTAexplorerの構成

システムはセパレーションユニット、フラクションコレクター、UNICORNを起動するパーソナルコンピュータ、プリンターで構成されています。

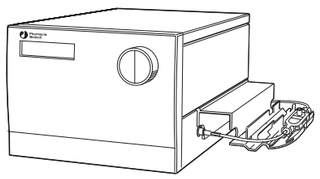


ÄKTAexplorer 10S / 100

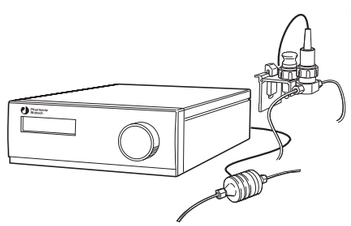


◆P-903ポンプ（ÄKTAexplorer 10Sの場合）
2ポンプ、流速　0.001～10ml/min、耐圧　25MPa

◆P-901ポンプ（ÄKTAexplorer 100の場合）
2ポンプ、流速　0.01～100ml/min、耐圧　10MPa

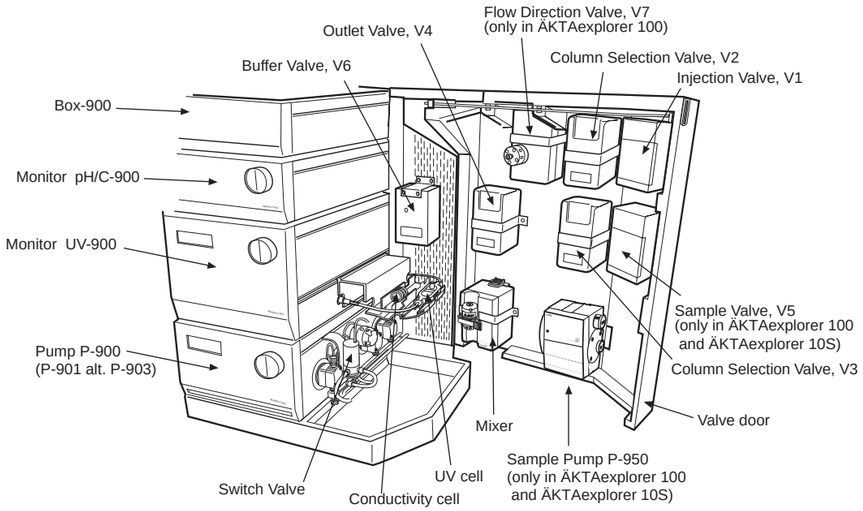


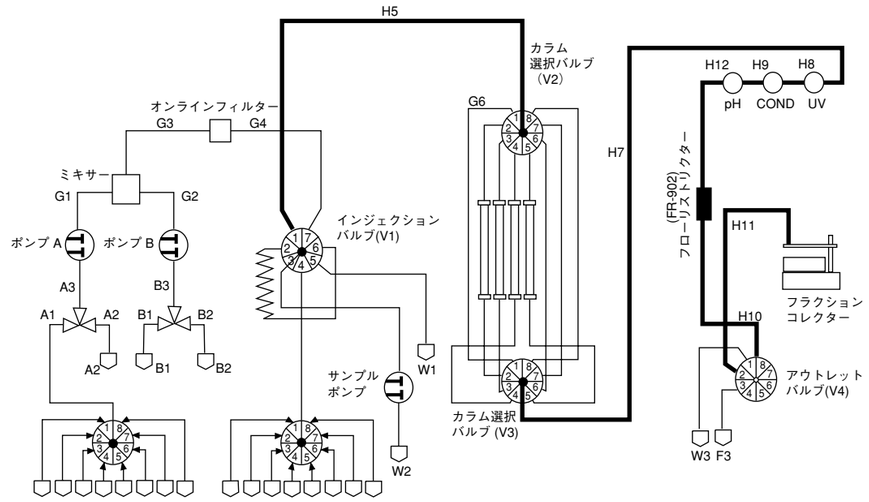
◆UV-900モニター
波長レンジ190-700nm可変UV-Visモニター。任意の3波長同時測定可能。explorer 10Sでは光路長10mm（8µl）。explorer 100では2mm（2µl）のフローセルが装備されています。



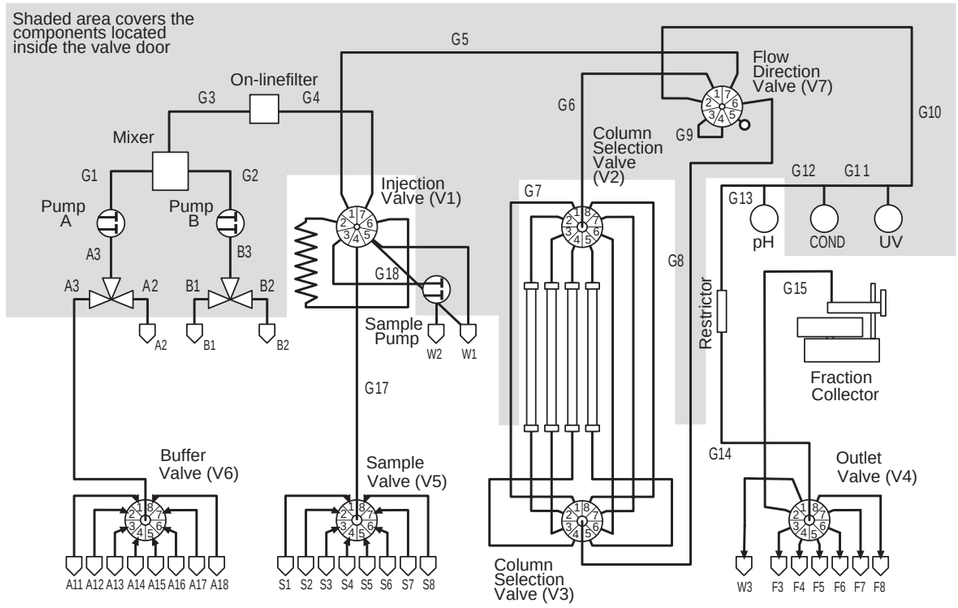
◆pH/C-900モニター
pH、コンダクティビティ（電気伝導度）のオンラインモニタリング

ÄKTAexplorer 10S / 100のセパレーションユニットの主なパーツの名称、取付け位置、流路を示します。

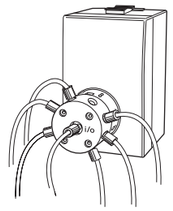


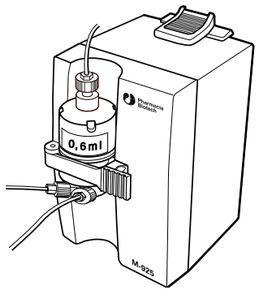

ÄKTAexplorer 10S



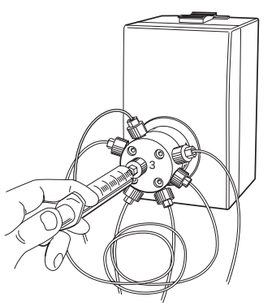

ÄKTAexplorer 100



◆バッファー選択バルブ
A1チューブの上流に接続され、8種類のバッファー（A11～A18）が接続可能です。




◆ミキサーM-925
explorer 10Sでは0.6mlのチャンバー、explorer 100では2mlのチャンバーを使用します。流速によっては2ml（標準）または5ml（オプション）12ml（オプション：explorer 100の場合）のチャンバーに交換します。

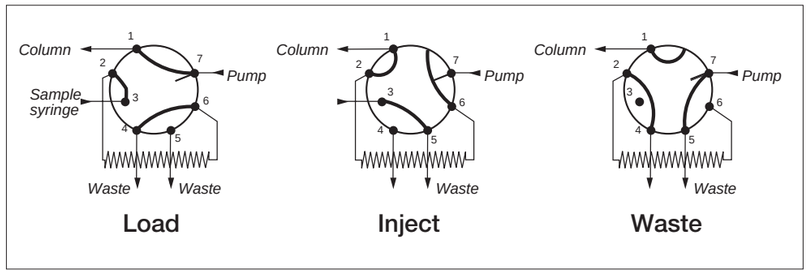


◆インジェクションバルブV1
サンプル添加用バルブです。サンプル添加量に応じて、適切なサイズのサンプルループを選択します。
ポジションは3つあり、流路を自動切替できます。

**Load**： 初期ポジション。バッファーはポンプからカラムに流れます。サンプルループにサンプルを充填するポジションです。

**Inject**： バッファーはポンプからサンプルループを通ってカラムに流れます。カラムにサンプルを添加するポジションです。

**Waste**：ポンプから廃液ビンに流れるポジションです。Pumpwashの時、自動的にこのポジションになります。

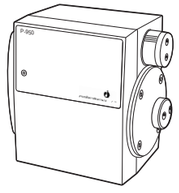


スーパーループ

◆サンプルループ／スーパーループ
インジェクションバルブV1のポート2、ポート6に接続します。サンプルループは、explorer 10Sには10µl、100µl、1mlが、explorer 100には500µl、2mlが標準で添付されています。大量のサンプルを添加する場合は、スーパーループ（オプション）を使用します。スーパーループは、10ml、50ml、150mlの3種類があります。

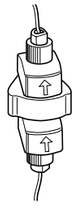
◆カラム選択バルブV2, V3
カラムが最大7本まで接続でき、どのカラムを使用するかプログラムすることにより自動的に選択できます。ポート1には流路洗浄用のバイパスチューブが接続されています。

◆サンプルバルブV5
最大7種類のサンプルを接続可能です。サンプルポンプにより自動的にサンプルループにサンプルを充填できます。ポート8は、サンプルバルブからインジェクションバルブまでのライン洗浄に使用します。



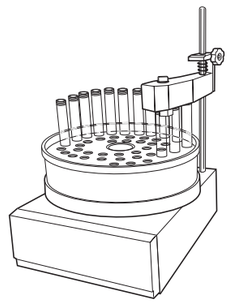
◆サンプルポンプ P-950
サンプル自動添加用ポンプ
流速0.1～50ml/min、耐圧1.0MPa

◆フローリストリクター
カラムの出口からモニター間での気泡発生を防ぐためにバックプレッシャーをかけます。FR-902（0.2MPa）とFR-904（0.4MPa）の2種類があり、pH電極を使用する場合はFR-902、逆相クロマトグラフィーを行う場合はFR-904を使用します。

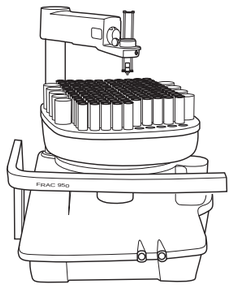


◆オンラインフィルター
ミキサーとインジェクションバルブの間に接続。
10S：フィルターはポアサイズ2µmのチタン製焼結フィルターです。バックプレッシャーが高くなった場合には、分解して焼結フィルターを2M NaOH中で超音波洗浄してください。洗浄しても圧が下がらない場合は、新品のフィルター（18-1120-94）と交換してください。
100：フィルターはポリプロピレン製です。バックプレッシャーが高くなった場合は、新品のフィルター（18-1027-11）に交換して下さい。





◆フラクションコレクターFrac-900
95本（10～18mm径）、175本（12mm径：100オプション）または40本（30mm径：オプション）の3種類のラックを使用できます。



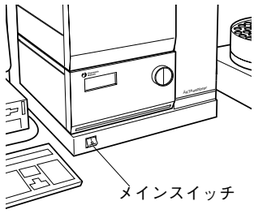

◆フラクションコレクターFrac-950
120本（18＆30mm径：標準装備）のラックA（黄）、240本（12mm径：オプション）のラックB（紫）、45本（30mm径：オプション）のラックD（赤）、96穴マイクロプレート4枚＆30mm径8本（オプション）のラックC（青）の4種類のラックを選択できます。

◆チュービング
用途に応じてチュービング（配管）を選択します。接続するチュービングの長さは場所によって決まっており、ラベルで識別できます。UVセルより下流のチュービングを交換した際は、17.1ディレイボリューム（127ページ）を参照して、ディレイボリューム（UVフローセルからフラクションコレクターまでのボリューム）を変更してください。

| チューブ | 内径（mm） | 用途 |
|---|---|---|
| 青色 | 0.25 | 逆相、高分離能カラム使用 |
| オレンジ色 | 0.5 | （explorer 10S標準）ほぼ全てのカラムに使用できる<br>pH電極使用時に使用 |
| 緑 | 0.75 | （explorer 100標準）<br>ほぼ全てのカラムに使用できる |
| ベージュ | 1.0 | 最大圧0.5MPa未満のカラムを高流速（＞10ml/min）で使用する場合使用する |

# 2. 起動

## 2.1 UNICORNの起動

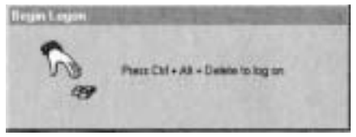



1. 本体のメインスイッチを入れます。

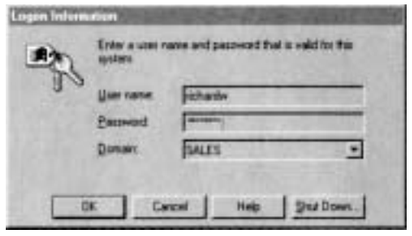
   注：コールドチャンバー内で使用する場合、本体の電源は常時ONにします。

2. コンピュータ、ディスプレイ、プリンタのスイッチをONにします。

3. コンピュータディスプレイにWindowsの**Begin Logon**ダイアログボックスが表示されます。キーボードの**Ctrlキー**と**Altキー**と**Deleteキー**を同時に押します。




4. **Logon Information**ダイアログボックスが表示されます。
   **Password**は入力せず、**OK**（または**Enter**キー）をクリックします。



5. Windowsのデスクトップが表示されます。

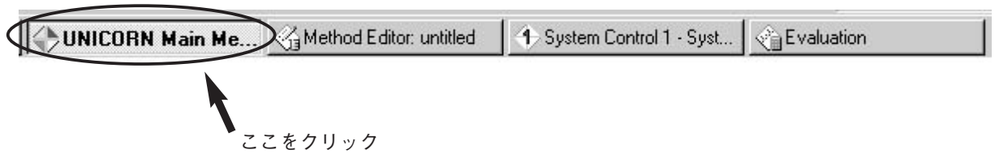
6. **UNICORNのアイコン**をダブルクリックします。

7. **Logon** ダイアログボックスが表示されます。
   **User name:**は**default**を選択し、パスワードも**default**と入力します。
   **OK**をクリックします。

   注：ユーザー登録後は、各々のユーザー名が表示されます。ユーザー名を選択し、パスワードを入力すると、各ユーザーのフォルダーにデータが保存されます。ユーザー登録は、2.3（13ページ）を参照してください。

8. システムとコンピュータが接続され、**System Information**ダイアログが表示されます。**Instruments are ready**の表示を確認し、**Clear All**をクリックしインフォメーション画面を閉じます。

9. タスクバーの**UNICORN Main Menu**をクリックします。




ここをクリック



## 2.2 画面操作

### 2.2.1 ツールバー、タスクバー

UNICORNには4つの操作モード（**UNICORN Main Menu**、**Method Editor**、**System Control**、**Evaluation**）があり、それぞれのモードに対応するツールバーとタスクバーがあります。

ツールバー

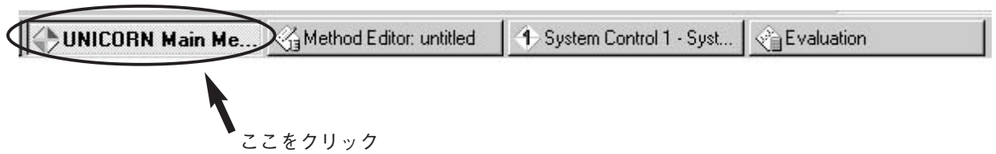
タスクバー

### 各アイコンの機能

| | | |
|---|---|---|
| UNICORN Main Me... | **UNICORN Main Menu** | ファイル管理<br>（Copy, Rename, Delete, Moveなど）<br>ハードディスクに保存されたファイルのリスト表示 |
| Method Editor: untitled | **Method Editor** | メソッドの作成、変更、編集 |
| System Control 1 - Syst... | **System Control** | システムをマニュアル操作で動かす、またはメソッドを実行 |
| Evaluation | **Evaluation** | データ処理。クロマトグラムのプリントアウト、ピーク面積計算など |
| | **Instant Run** | 手法、テンプレート及びカラムを選択し、標準メソッドを実行 |
| | **UNICORNについて** | UNICORNのバージョン表示 |
| | **Logon/Logoff** | UNICORNのLogon/Logoff |
| | **Method Quene** | Method QueneのEditor表示 |
| | **Display running** | 実行中のMethod Queneを表示 |

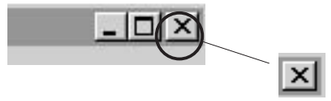
### 2.2.2 画面操作

1. 操作モードの選択は、そのツールバーまたはタスクバーをクリックします。




2. コマンドは、メニューバーをクリックし、プルダウンメニューから選択します。
   または、ウインドウでマウスの右ボタンをクリックし、メニューからコマンドを選択します

3. モードのウィンドウを閉じる時は、**Closeボタン**をクリックします。



4. モード間の移動は、移動したいモードのタスクバーをクリックします。

5. マニュアル操作のコマンドは次のように表示します。

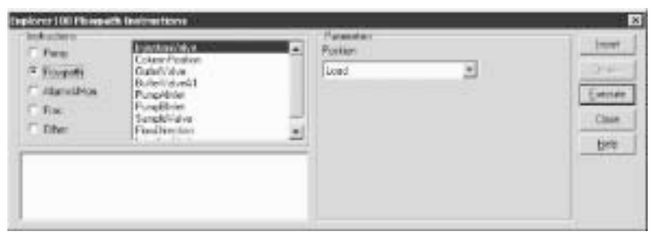
   5-1 メニューバーの**Manual**をクリック
   **Manual** ↓

   5-2 プルダウンメニューの**Flowpath**をクリック
   **Manual** ↓ **Flowpath**

   5-3 メニューから**Sample Valve**コマンドを選択
   **Manual** ↓ **Flowpath** → **SampleValve**

   5-4 パラメータのS1を選択
   **Manual** ↓ **Flowpath** → **SampleValve** → **S1**

   5-5 **Execute**をクリックすると実行します。





## 2.3 ユーザー登録

データはコンピュータのハードディスクに自動的に保存されます。ハードディスクには、データを保存するフォルダをユーザーごとに作成することができます。ユーザーとして登録すると、Logon時にユーザーの選択ができ、各ユーザーのフォルダのデータを保存することができます。

1. タスクバーの**UNICORN Main Menu**をクリックします。

2. メニューバーより、
   **Administration** ↓ **User Setup...**

3. **User Setup**画面が表示されます。**New**ボタンをクリックし、**Create New User**画面を表示させます。

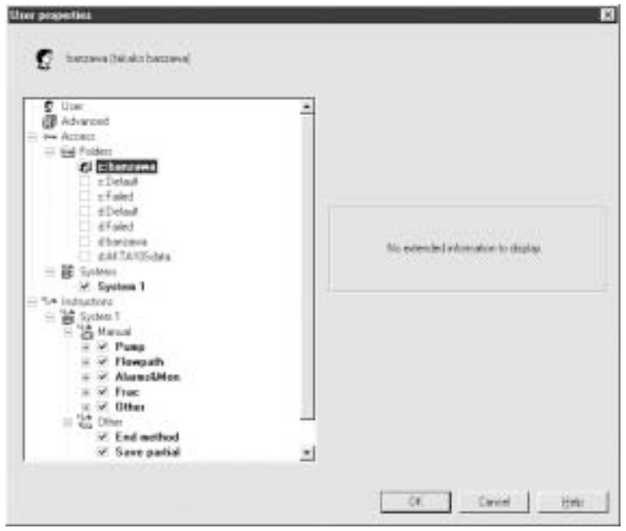
- **User Name** ユーザー名を入力します。
- **Full name** フルネームを入力します。
- **Position** 所属を入力します

4. **Home folder**の**New**ボタンをクリックすると、**Create New Folder**ウィンドウが開きます。
   **Folder name**にフォルダ名を入力し、**OK**ボタンをクリックします。

5. **Create New User**画面の**OK**ボタンをクリックすると、**User Setup**画面に戻ります。
   ここで新しく表示された**User**を選択し、**Edit**ボタンをクリックします。

6. **User properties**の**Access**をダブルクリックして展開します。
   **Folders**をダブルクリックし、アクセスしたいフォルダを指定します。（今回作成したホームフォルダはあらかじめ選択されています。）

7. **User properties**の**Systems**をダブルクリックして展開します。
   **System1**をチェックします。




8. **OK**ボタンをクリックし、続いて**User Setup**画面の**Close**ボタンをクリックしてユーザー登録を終了します。

> アクセスできるMethodフォルダー、Resultsフォルダーは Logonしたユーザーごとに異なります。使用者を交代する場合は、9〜12までの手順で、再Logonしてください。

9. メニューバーの**Logon/Logoff**アイコンをクリックします。
確認画面が表示されますので、**Yes**をクリックします。

10. **Leave Control of System1**ダイアログが表示されます。

**Unlocked**を選択して**OK**ボタンをクリックします。

11. タスクバーの**UNICORN Main Menu**をクリックし、再度メニューバーの**Logon/Logoff**アイコンをクリックします。



12. **Logon**ダイアログが表示されます。

ユーザー名を選択し、パスワードには**default**と入力し、**OK**ボタンをクリックします。

13. **Change Password**画面が表示されます。パスワードを入力して下さい。

・**Logon password**

| | |
|---|---|
| **Old** | パスワード**default**を入力 |
| **New** | 新しいパスワードを入力 |
| **Confirm** | 確認のため再度パスワードを入力 |

・**Signature password**

| | |
|---|---|
| **Old** | **default**を入力 |
| **New** | 新しいパスワードを入力（Logon passwordとは異なるもの） |
| **Confirm** | 確認のため再度パスワード（Logon passwordとは異なるもの）を入力 |

**OK**ボタンをクリックします。

# 3. システム準備

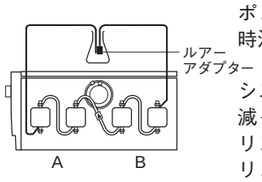
システムの準備は、**System Control**のモードで行います。タスクバーの**System Control**をクリックします。

## 3.1　廃液チューブ

廃液チューブ**W1, W2, W3**（白いテフロンチューブ）と**F3**（10S：オレンジのPEEKチューブ、100：テフロンチューブ）の4本のチューブを廃液瓶に接続します。

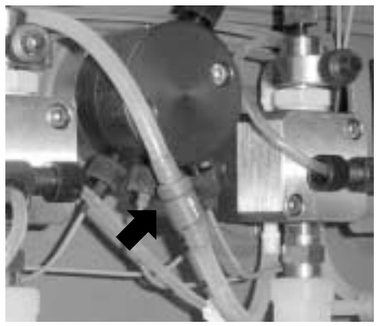
> 注：素通りフラクションは**F3**より廃液されます。素通りフラクションをフラクションコレクターでなく一括で分画する場合は、**F3**チューブを別の容器に接続しておきます。

## 3.2　リンス液のチェック




ポンプピストンの裏側のシーリングから漏れた溶液をリンス液（20%エタノール）で常時洗浄しています。

システム使用前にリンス液が減っていないか、濁っていないかを確認してください。
減っていたり、濁っている場合は交換してください。
リンス液はPumpが動いている時に循環します。循環しない場合はルアーアダプターにシリンジを接続し、リンス液を吸引します。または矢印が刻印されたパーツ（図参照）を超音波洗浄します。
Pumpに接続されているリンスチューブが液もれしてないかも確認しておきます。

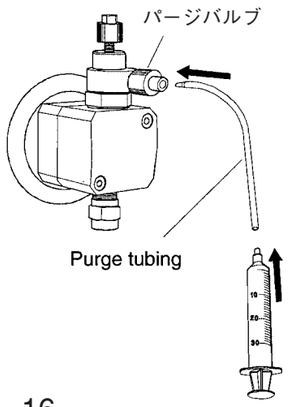


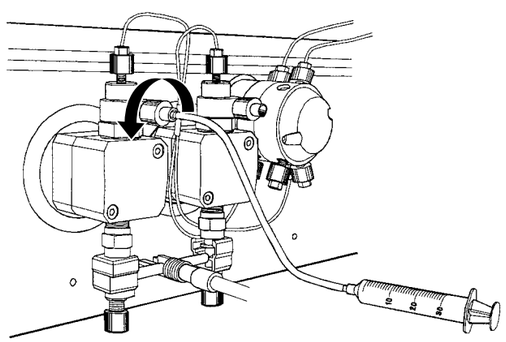
## 3.3　ポンプのパージ（エアー抜き）

ポンプはインレットチュービングやポンプヘッドにエアーがあると正確な送液ができません。
インレットチューブ**A11, A2, B1, B2**のパージ（エアー抜き）を行ってください。パージは各Pumpのヘッド毎に行います。

1. インレットチューブ（**A11, A2, B1, B2**）を脱気した超純水に接続します。

2. まず、**A11, B1**のパージを行います。パージバルブにパージチューブング、30mlのシリンジを接続します。





3. 接続したポンプヘッドのパージバルブを反時計回りに半回転し、超純水をシリンジで吸引します。

> 注：ゆっくり引いてください。急激に吸引すると、陰圧となり気泡が発生します。

4. 超純水がシリンジの中に入り始めたら、そのまま数ml吸引し、パージバルブを閉めます。

5. 2〜4の操作を全てのポンプヘッドについて行います。

6. 次にラインを**A2, B2**のチューブに切り換えます。
タスクバーの**System Control**をクリックします。
**Manual ↓ Flowpath → PumpAInlet → A2**
**Execute**をクリックします（A11からA2になります）。

**Manual ↓ Flowpath → PumpBInlet → B2**
**Execute**をクリックします（B1からB2になります）。

7. 2〜4の操作で**A2, B2**チューブをパージします。

## 3.4　圧力の安定性チェック

パージ（エアー抜き）が完全に行われたかどうかは、送液時の、圧力変動で確認することができます。

1. タスクバーの**System Control**をクリックします。ウインドウ選択ボタン（左図アイコン）をクリックします。

**Run data**と**Curves**をチェックし、**OK**をクリックします。

2. Aポンプ（**A11**）からの送液
**Manual ↓ Pump → Flow → 5ml/min**
**Execute**をクリックします。

3. ポンプ本体の液晶パネル、またはディスプレーのPressureカーブで圧力変動をチェックします。

4. Bポンプ（**B1**）からの送液
**Manual ↓ Pump → Gradient → Target 100%B**
**Execute**をクリックします。

5. ポンプ本体の液晶パネル、またはディスプレーのPressureカーブで圧力変動をチェックします。

6. Bポンプ（**B2**）からの送液
**Manual ↓ Flowpath → PumpBInlet → B2**
**Execute**をクリックします。

7. ポンプ本体の液晶パネルとディスプレーのPressureカーブで圧力変動をチェックします。

8. Aポンプ（**A2**）からの送液
   **Manual ↓ Pump → Gradient → Target 0%B**
   **Execute**をクリックします。

   **Manual ↓Flowpath → PumpBInlet → A2**
   **Execute**をクリックします。

| |
|---|
| A11, A2, B1, B2の圧力が同じで、変動が±0.05MPa以内であることを確認してください。変動が大きい場合はそのポンプヘッドのパージをもう一度行ってください。 |

9. **End**ボタンをクリックし、終了します。



# 4. システム洗浄

2日以上使用しない場合は、システムを20%エタノールで置換しておきます。
再使用の前には、脱気した超純水で流路を洗浄した後に、バッファー溶液を送液してください。

## 4.1 ポンプ洗浄

インレットチューブ及びポンプを洗浄します。

1. タスクバーの**System Control**をクリックします。

2. ポンプ洗浄コマンドを入力します。
   **Manual ↓ Pump → PumpWash Explorer → A11, ON, ON, ON**
   **Execute**をクリックします。

約5分で洗浄は自動終了します。

**PumpWashの流路：**ポンプ → ミキサー → インジェクションバルブ（Waste）
→ 廃液チューブW1

## 4.2 システム洗浄

インジェクションバルブから下流の流路を洗浄します。

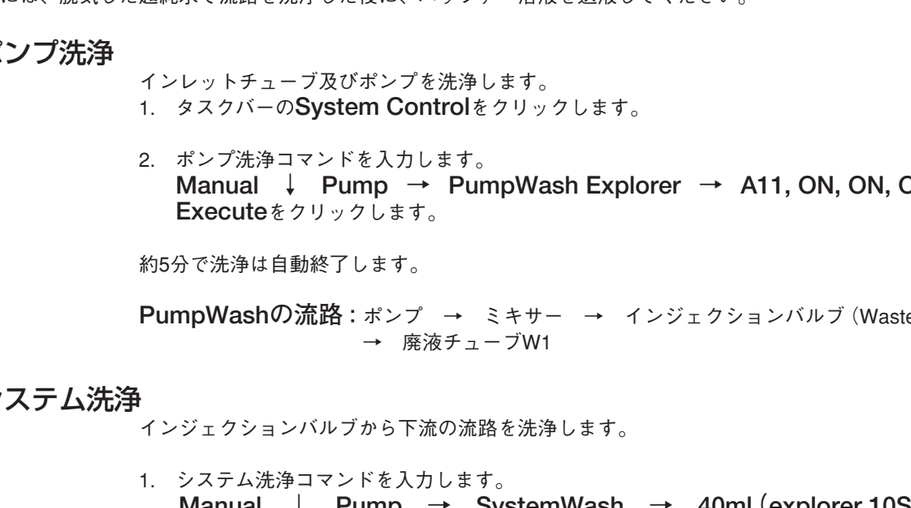
1. システム洗浄コマンドを入力します。
   **Manual ↓ Pump → SystemWash → 40ml（explorer 10S）、75ml（explorer 100）**
   **Execute**をクリックします。

約5分で洗浄は終了します。

**SystemWashの流路：**ポンプ → ミキサー → インジェクションバルブ（Load）
→ カラム選択バルブ(Position1 Bypass) → UVフローセル
→ コンダクティビティーセル → pH電極セル
→ アウトレットバルブ → 廃液チューブW3

## 4.3 サンプルポンプ洗浄

サンプルポンプP-950を使用する際は、使用目的に合わせた配管と、配管ごとに定められた使用前準備が必要です。
詳細は「7. サンプル添加の準備」（24ページ）をご参照ください。




ÄKTAexplorer 10S

# 5. カラムの接続

## 5.1　カラムの配管

カラムを接続する場合、コネクターを1/16”maleに変換します。
PEEKチューブは付属のチュービングカッターで切断してください。

SRTC-2

### ・FPLC用カラム

カラムにはM6オスコネクターが付いてます。
Union M6 female /1/16”male, PEEK（18-1112-58　8個入り）を使用してください。
カラムに付いたチューブが短い場合は、SRTC-2（19-2143-01：オプション）が必要です。

### ・ÄKTA用カラム（他社カラムも同様）

カラムは1/16”メスになっています。
0.5mm PEEKチューブ（100：0.75mm PEEKチューブ）とFingertight Connector,1/16”（18-1112-55　10個入り）でチュービングを作り接続します。

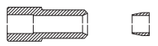
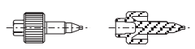
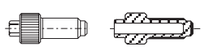
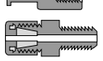
### ・HiTrapカラム

カラムの入口がM6メス、出口がM6オスになっています。
0.5mm PEEKチューブ（100：0.75mm PEEKチューブ）とFingertight Connector,1/16”（18-1112-55　10個入り）でチュービングを作り、カラム選択バルブに接続します。
カラム入口にUnion 1/16”female/M6 male, PEEK（18-1112-57　6個入り）を付けチュービングを接続します。
出口はUnion M6 female/1/16”male, PEEK（18-1112-58　8個入り）を使用し、直接カラム選択バルブに接続します。

> 注：しっかり縮めても、どうしてもカラムの接続部から液もれする場合は、Oリング（Tubing End fitting 19-2148-01)を使用して下さい。

### ・HiPrepカラム

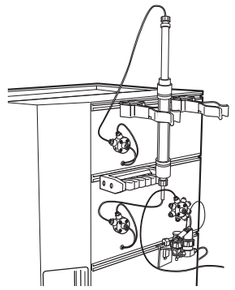
M6メスになっています。
Union 1/16”female/M6 male, PEEK（18-1112-57　6個入り）を使用します。
カラム選択バルブとの接続は、0.5mm PEEKチューブ（100：0.75mm PEEKチューブ）とFingertight Connector, 1/16”（18-1112-48　10個入り）でチュービングを作り接続します。

| | *製品* | *数量* | *コード番号* |
|---|---|---|---|
| | ***コネクターとユニオン*** | | |
| | Fingertight Connector, 1/16” for 1/16” o.d. tubing, PEEK | 10 | 18-1112-55 |
|  | Tubing connector, for 3/16” o.d. tubing, PEEK | 10 | 18-1112-49 |
| | Ferrules for 3/16” o.d. tubing, PEEK | 10 | 18-1112-48 |
| | UNion 1/16” female/M6 male,PEEK | 6 | 18-1112-57 |
| | Union M6 female/1/16” male, PEEK | 8 | 18-1112-58 |
| | Union Luer female/1/16” male, PEEK | 2 | 18-1112-51 |
|  | Stop plug, 1/16”, PEEK | 5 | 18-1112-52 |
|  | Stop plug, 5/16”, PEEK | 5 | 18-1112-50 |
| | Union, 1/16”female/1/16”female, titanium | 1 | 18-3855-01 |
| | Union Luer female/M6 female | 1 | 18-1027-12 |
|  | Tubing connector, M6 male | 5 | 19-1993-50 |



| | | |
|---|---|---|
| ***チュービング*** | | |
| Teflon tubing, i.d. 1.6 mm, o.d. 1/8” | 3 m | 18-1121-16 |
| Inlet filter assembly | 1 | 18-1113-15 |
| Inlet filter set for 10 ml | 10 | 18-1113-16 |
| PEEK tubing, i.d. 0.25 mm, o.d. 1/16”（Blue） | 2 m | 18-1120-95 |
| PEEK tubing, i.d. 0.50 mm, o.d. 1/16”（Orange） | 2 m | 18-1113-68 |
| PEEK tubing, i.d. 0.75 mm, o.d. 1/16”（Green） | 2 m | 18-1112-53 |
| PEEK tubing, i.d. 1.0 mm, o.d. 1/16”（Gray） | 2 m | 18-1115-83 |
| Tefzel tubing, i.d. 0.25 mm, o.d. 1/16” | 2 m | 18-1121-36 |
| Tefzel tubing, i.d. 0.50 mm, o.d. 1/16” | 2 m | 18-1120-96 |
| Tefzel tubing, i.d. 0.75 mm, o.d. 1/16” | 2 m | 18-1119-74 |
| Tubing kit, i.d. 0.25 mm, for Purifier | 1 | 18-1123-34 |
| Tubing kit, i.d. 0.50 mm, for Purifier | 1 | 18-1123-33 |
| Tubing kit, i.d. 0.25 mm, for Explorer 10S | 1 | 18-1122-12 |
| Tubing kit, i.d. 0.50 mm, for Explorer 10S | 1 | 18-1123-21 |

## 5.2　カラムの接続



カラムにエアーが入らない様に、ポンプより送液しながら接続してください。

1. 接続するカラム選択バルブのポジションを選択します。
   **Manual → Flowpath → ColumnPosition →　（接続するポジション）**
   **Execute**をクリックします。

   **Manual → Pump → Flow → 0.5ml/min**
   **Execute**をクリックします。

2. カラム選択バルブ（または接続するチューブから）水が出てきたら、カラムを接続します。

3. **END**ボタンをクリックして終了します。

## 5.3　カラムの準備

カラムは20%エタノールに置換し保存します。使用前にカラムは超純水で置換します。

1. カラムのPressure limitの設定
   **Manual → Alarms&Mon → Alarm_Pressure →　High Alarm（カラムの耐圧）**
   **Execute**をクリックします。

2. 置換するカラム選択バルブのポジションを選択
   **Manual → Flowpath → ColumnPosition →　（置換するカラムポジション）**
   **Execute**をクリックします。

3. 流速の設定
   20%エタノールがカラムに残っている間はバックプレッシャーが高くなります。水に置き変わるまで、少し低流速で流してください。
   **Manual → Pump → Flow →　カラムの至適流速の1/2**
   **Execute**をクリックします。

   > 注：低温環境でご使用になる場合は、液の粘性が上がるので至適流速の1/4で送液してください。

4. カラムのベットボリュームの3倍以上流し、UV, Cond, Pressure カーブが安定したら**END**ボタンをクリックし終了します。

### HiPrepカラムを低温でÄKTAシステムにて使用する場合の注意点

カタログに記載のカラムの最大流速値は、室温で超純水を送液する場合の流速です。低温では液の粘性が上昇するために送液圧力が上昇します。HiPrepカラムは耐圧が0.15MPaと低いため、低温では、ご使用中にプレッシャーリミットが働いてシステムが停止する可能性もあります。
粘性の高いバッファー（高濃度の硫安やウレア、グリセロールなどを含むもの）を使用する場合には十分ご注意ください。
AKTAシステムでご使用の場合には、

**0.35 MPa＝「HiPrepカラムの耐圧0.15 MPa」＋「フローリストリクターFR-902の0.2 MPa」**

をプレッシャーリミットに設定してください（UNICORNソフトウェアの初期値は0.5 MPaです。ご注意ください）。
粘性の高い溶液をご使用の際には、この設定圧を超えない流速範囲でのご使用をお願いいたします。



# 6. 溶液交換

## 6.1 溶液交換

1. ポンプのインレットチューブに使用する溶液（バッファー）を接続します。

2. **Manual ↓ Pump → Pumpwash Explorer → A11, ON, ON, ON**
   **Execute**をクリックします。　　（使用するインレットチューブ）

使用するインレットチューブ

| | |
|---|---|
| 1液送液（ゲルろ過）の時： | A11 |
| 2液送液（イオン交換等）の時： | A1/B1 |
| BufferPrep機能を使用する時： | A11（Buffer） |
| | A2（Acid/Base） |
| | B1（Water） |
| | B2（Salt） |

## 6.2 ポンプの確認

溶液交換後、配管間違いがないか、正しく溶液交換されているか、UV、Cond、Pressureカーブが安定していることで確認してください。

1. Aポンプの確認
   **Manual ↓ Pump → Flow → 5ml/min**
   **Execute**をクリックします。

2. Bポンプの確認
   **Manual ↓ Pump → Gradient → Target 100%B**
   **Execute**をクリックします。

3. バッファープレップする場合は**B2**も確認
   **Manual ↓ Flowpath → PumpBInlet → B2**
   **Execute**をクリックします。

4. 同様に**A2**も確認します。
   **Manual ↓ Pump → Gradient → Target 0%B**
   **Execute**をクリックします。

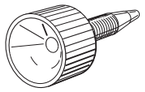
   **Manual ↓ Flowpath → PumpAInlet → A2**
   **Execute**をクリックします。

5. **END**ボタンをクリックし終了します。

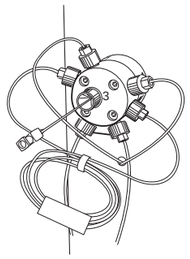
# 7. サンプル添加の準備

添加したい量のサンプルループをインジェクションバルブV1（**ポート2**と**6**）に接続します。

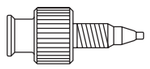
## 7.1 マニュアルサンプル充填



1. インジェクションバルブの**ポート3**から、サンプルポンプに接続されたチューブを外します。
2. インジェクションフィルポート（18-1127-66）にインジェクションニードル（外径0.7mm、18-1801-42）を差し込みます。
3. **ポート3**に、インジェクションニードルを差したままインジェクションフィルポートをねじ込みます。
4. インジェクションニードルを抜きます。
5. インジェクションフィルポートにシリンジホルダーを差し込みます。
6. サンプルバルブの**S1**に廃液を入れるチューブをセットします。
7. シリンジを使用してサンプルループを開始バッファーで洗浄（サンプルループの3倍以上）します。

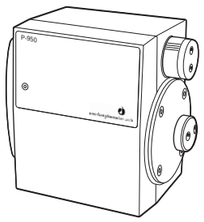


大量のサンプル（2ml以上）を添加する場合は、インジェクションフィルポートのかわりに、ルアーロックアダプター（18-1112-51）を使用します。



## 7.2 Sample Pump P-950

仕様　流速範囲　：0.1～50ml/min
　　圧力　　：～1.0MPa（10 bar, 145 psi）



**・P-950使用目的**

**A　サンプルループへのサンプル自動充填**
（サンプルループへのサンプル自動添加。連続運転時に使用。7サンプルまで対応→7.3項へ）

**B　スーパーループへのサンプル充填**
（スーパーループへのサンプルの自動充填→7.4項へ）

**C　背圧1MPaまでのカラムへの大量サンプル直接添加**
（大量サンプルのダイレクトローディング→7.5項へ）



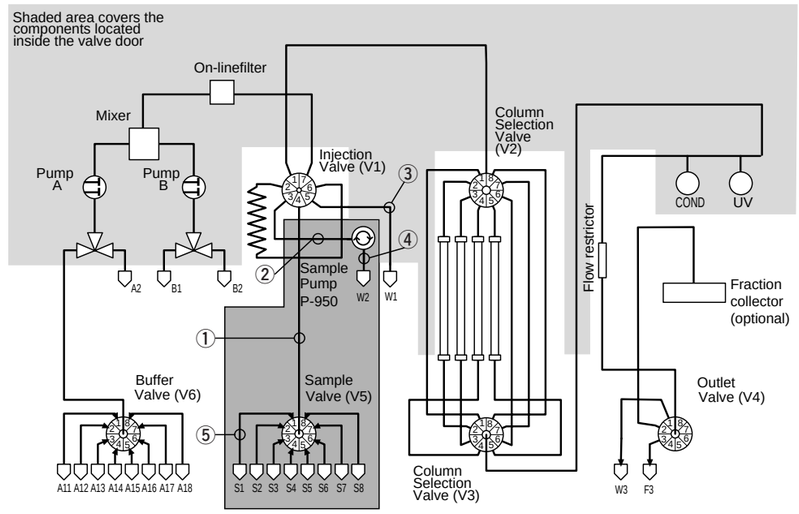
## 7.3　サンプルループへの自動サンプル充填（標準配管）
**※流速は2ml/min以下に設定してください。**

### 7.3.1　配管

配管を以下の図のようにつなぎます。
サンプルは以下の流路で流れます※。

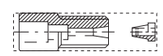
**サンプル　→　サンプルインレットチュービング⑤　→　サンプルバルブ（センターポート①）　→　インジェクションバルブポート4　→　サンプルループ　→　インジェクションバルブポート3②　→　P-950インレット　→　P-950 アウトレット④　→　廃液**

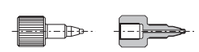
※このときの インジェクションバルブのポジションは**Load**です。

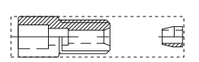



| チュービング（最長） | コネクター | 接続 |
|---|---|---|
| ①<br>PEEK内径0.75mm×20cm（緑） | Figertight connector 1/16”, 18-1112-55 | インジェクションバルブポート4 |
| | Figertight connector 1/16”, 18-1112-55 | サンプルバルブ中央ポート |
| ②<br>PEEK内径0.75mm×50cm（緑） | Figertight connector 1/16”, 18-1112-55 | インジェクションバルブポート3 |
| | Tubing connector for 1/16”o.d. tubing, 18-1127-07<br>with ferrule for 1/16”o.d. tubing（青）, 18-1127-06 | サンプルポンプインレット |
| ③（W2）<br>Tefzel内径0.75mm×130cm（白） | Figertight connector 1/16”, 18-1112-55 | インジェクションバルブポート5 |
| ④<br>テフロン内径1.6mm×130cm（白） | Union 5/16“female / HPLC male, 18-1142-08<br>Tubing connector for 1/8”o.d. tubing, 18-1121-17<br>with ferrule for 1/8”o.d. tubing（黄）, 18-1121-18 | サンプルポンプアウトレット |
| ⑤<br>Tefzel内径0.75mm×320cm（白） | Figertight connector 1/16”, 18-1112-55 | サンプルバルブポート1-8 |

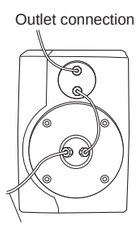
Fingertight connector 1/16”


Tubing connector for 1/16” o.d. tubing with ferrule for 1/16” o.d. tubing　青


Union 5/16” female/HPLC male


Tubing connector for 1/8” o.d. tubing with ferrule for 1/8” o.d. tubing　黄

**Pump P-950**



### 7.3.2　サンプルの準備

**System Control**モードに入ります。

1. サンプルが通る共通ラインの洗浄液として、開始バッファー（バッファーA）をサンプルインレットチュービング**S8**につける※1。
   ※1：1種類のサンプルしか使用しない場合、**S8**の洗浄は省略しても構いません。

2. 使用するインレットチュービング（S1-S7）のインレットチュービングにサンプルをつける。

3. **Manual** ↓ **Flowpath** → **SampleValve** → **S1**（使用するサンプルバルブのインレットを指定）を選択 → **Execute**

4. **Pump** ↓ **SampleFlow** → **2ml/min** → **Execute**
   10秒ほど送液（約0.35ml分）し、S1チュービングをサンプルで満たす → **End**

5. 複数のサンプルを使う場合は、3-4の操作を繰り返す（S2-S7）

6. **Flowpath** ↓ **SampleValve** → **S8** → **Execute**

7. **Pump** ↓ **SampleFlow** → **2ml/min** → **Execute**
   この作業により、洗浄液でサンプルが通る共通ライン（サンプルバルブ-インジェクションバルブ内）を満たし、1分間送液後 **End**

8. **Flowpath** ↓ **InjectionValve** → **Inject** → **Execute**

9. **Pump** → **Flow** → **2ml/min** → **Execute**
   この作業により、サンプルループの5倍体積分ほど送液し開始バッファーで交換する
   → **End**

> この配管で使用して実験を行う場合、メソッド作成時の**Injection Technique**は
> **Sample Pump Loop Filling**
> を選択します。



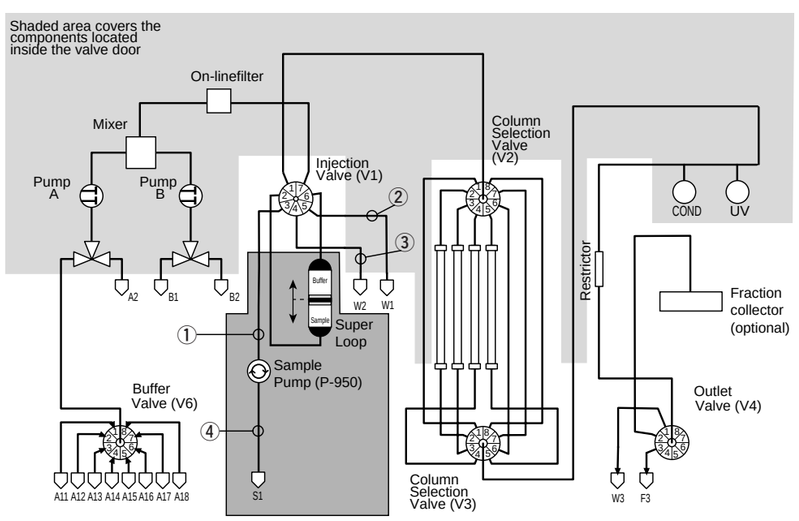
## 7.4　スーパーループへの自動サンプル充填

### 7.4.1　配管

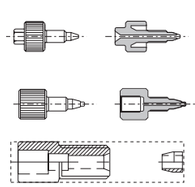
下図の様に配管してください。
サンプルは以下の流路で流れます※2。

**サンプル → サンプルインレットチュービング④ → P-950インレット → P-950 アウトレット① → インジェクションバルブ（ポート3） → インジェクションバルブポート2（スーパーループ0メモリ側） → インジェクションバルブポート6 → 廃液（インジェクションバルブポート4③より）**

※2 このときの インジェクションバルブポジションは**Load**です。




| チュービング（最長） | コネクター | 接続 |
|---|---|---|
| ①（サンプルインレットチュービング）<br>PEEK内径1.0mm×50cm（ベージュ） | Figertight connector 1/16”, 18-1112-55 | インジェクションバルブポート3 |
| | Figertight connector 1/16”, 18-1112-55 | サンプルポンプアウトレット |
| ②<br>テフロン内径1.6mm×130cm（白） | Union 5/16”female / HPLC male 18-1142-08<br>Tubing connector for 1/8”o.d. tubing 18-1121-17<br>with ferrule for 1/8”o.d. tubing 18-1121-18 | インジェクションバルブポート5 |
| ③<br>Tefzel内径0.75mm×130cm（白） | Figertight connector 1/16”, 18-1112-55 | インジェクションバルブポート4 |
| ④<br>テフロン内径1.6mm×130cm（白） | Tubing connector for 1/8”o.d. tubing 18-1121-17<br>with ferrule for 1/8”o.d. tubing 18-1121-18 | サンプルポンプインレット |

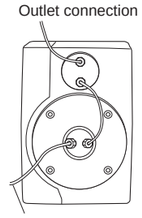


Fingertight connector 1/16”

Union 5/16” female/HPLC male

Tubing connector for 1/8” o.d. tubing with ferrule for 1/8” o.d. tubing　黄

**Pump P-950**



### 7.4.2　スーパーループの接続と準備

1. スーパーループに溶液（開始バッファー）が充填されているか確認します。
（スーパーループの取扱説明書を参照）

2. スーパーループをできるだけインジェクションバルブに近づけてカラムホルダに取り付けます。

3. 底側（サンプル側 0目盛）のチュービングをインジェクションバルブの**ポート2**へ接続します。

4. 上側（バッファー側）のチュービングをインジェクションバルブの**ポート6**へ接続します。

5. 全ての配管を手でしっかりと締めます。

6. **Manual ↓ Alarms&Mon → Alarm_Pressure → High Alarm 4MPa（スーパーループ150mlの場合は2MPa） → Execute**

7. **Manual ↓ Flowpath → InjectionValve → Inject → Execute**

8. **Manual ↓ Pump → Flow → 10ml/min → Execute**

9. ムーバブルシールがスーパーループの底に達するまで移動させ、**End**

> 注：サンプルの性質やバッファー等の実験条件を大きく変更する場合は、P-950のキャリブレーションを行う必要があります。またその時、必ずインジェクションバルブを**Inject**に切り替えてからキャリブレーションしてください。

### 7.4.3　パージ操作

接続した配管内のエアを抜きます。

> 注：（ ）内は、低温室、クロマトチャンバー内にてシステムを使用する際の数値です。

1. インレットチュービングを脱気超純水の入ったボトルにセットします。

2. **Manual ↓ Flowpath → InjectionValve → Inject → Execute**

3. **Pump ↓ SampleFlow → 10ml/min（5ml/min）* → Execute**

4. **約1分間（2分間）**送液後、**Pause**

5. インレットチュービングを96%エタノールの入ったボトルに移します。

6. **Pump ↓ SampleFlow → 50ml/min（25ml/min） → Execute → Continue**

7. **約2分間（4分間）**送液後、**Pause**

8. インレットチュービングを脱気超純水の入ったボトルに移します。

9. **Pump ↓ SampleFlow → 1ml/min → Execute → Continue**

10. 1分間送液後、**SampleFlow → 10ml/min（5ml/min） → Execute**



11. **3分間（6分間）**送液後、**End**

12. インレットチュービングをサンプルの入ったボトルに移します。

### 7.4.4　サンプルの準備

1. サンプルインレットチュービングをサンプルボトルにつけます。このときチュービングの先端がボトルの底についていることを確認してください。

2. サンプルポンプを作動させ、サンプルインレットチュービングからインジェクションバルブまでをサンプルで満たします。この際必要な液量は約**5ml**です。
**Manual ↓ Flowpath → InjectionValve → Inject → Execute**

3. **Manual ↓ Pump → SampleFlow → 2ml/min**

4. 5ml流れたころ、**End**

> この配管を使用して実験を行う場合、メソッド作成時の**Injection Technique**は
> **Sample Pump Loop Filling**
> を選択します。

## 7.5　カラムへのサンプル直接添加

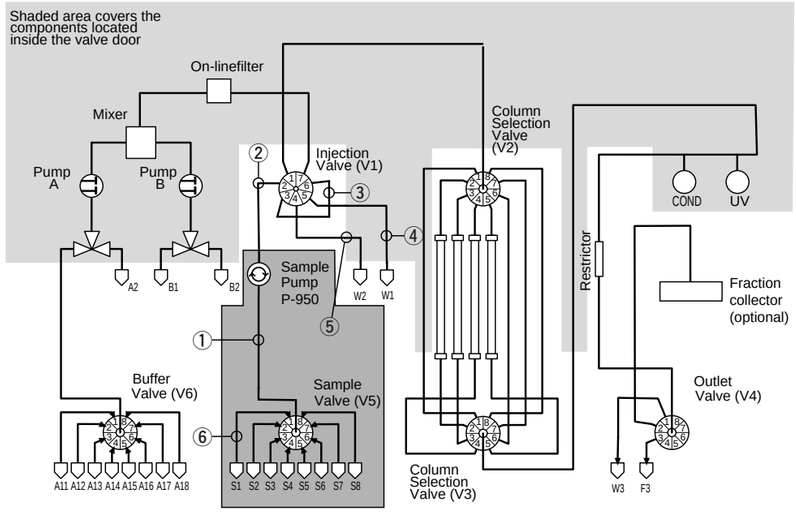
**※バックプレッシャー1MPa以下のカラムに、サンプルを直接添加することができます。**

### 7.5.1　配管

下図の様に配管してください。（P-950 Direct Load Tubing Kit 18-1152-83）使用。
サンプルは以下の流路で流れます※3。

**サンプル → サンプルインレットチュービング⑥ → サンプルバルブ（センターポート①） → P-950インレット → P-950 アウトレット② → インジェクションバルブ（ポート2）→ インジェクションバルブポート 1 からカラムへG5**

※3 このときの インジェクションバルブポジションは**Inject**です。



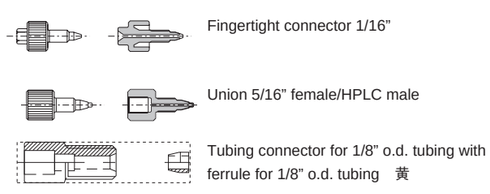

サンプルが1種類の場合、サンプルバルブを使用しません。
その場合、①のチューブに直接サンプルを接続してください。

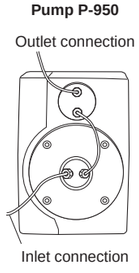
| チューブング（最長） | コネクター | 接続 |
|---|---|---|
| ①<br>Teflon内径1.6mm×50cm（白） | Union 5/16“female / HPLC male 18-1142-08<br>Tubing connector for 1/8”o.d. tubing 18-1121-17<br>with ferrule for 1/8”o.d. tubing〔黄〕18-1121-18 | サンプルバルブ中央ポート |
| | Tubing connector for 1/8”o.d. tubing 18-1121-17<br>with ferrule for 1/8”o.d. tubing〔黄〕18-1121-18 | サンプルポンプインレット |
| ②<br>PEEK内径1.0mm×50cm（ベージュ） | Figertight connector 1/16”18-1112-55 | インジェクションバルブポート2 |
| | Figertight connector 1/16”18-1112-55 | サンプルポンプアウトレット |
| ③<br>PEEK内径0.75mm×15cm（緑） | Figertight connector 1/16”18-1112-55 | インジェクションバルブポート3 |
| | Figertight connector 1/16”18-1112-55 | インジェクションバルブポート6 |
| ④<br>Tefzel内径0.75mm×130cm（白） | Figertight connector 1/16”18-1112-55 | インジェクションバルブポート5 |
| ⑤<br>テフロン内径1.6mm×130cm（白） | Union 5/16“female / HPLC male 18-1142-08<br>Tubing connector for 1/8”o.d. tubing 18-1121-17<br>with ferrule for 1/8”o.d. tubing〔黄〕18-1121-18 | インジェクションバルブポート4 |
| ⑥<br>テフロン内径1.6mm×130cm（白）* | Union 5/16“female / HPLC male 18-1142-08<br>Tubing connector for 1/8”o.d. tubing 18-1121-17<br>with ferrule for 1/8”o.d. tubing〔黄〕18-1121-18 | サンプルバルブポート1-8 |

*：サンプルバルブ使用時のみ。130cmは最長の長さになります。サンプルボトルの設置状況に応じて短くすることができます。

**注意** サンプルバルブの使用しないポートにはストッププラグを付けてください。

**注意** **低流速（≦10ml/min）**でサンプルポンプP-950を使用する場合は、サンプルバルブのポート1-8のサンプルインレットチュービングは**テフロン 内径0.75mm（納品時標準配管）**が使用できます。




## 7.5.2 パージ操作

配管内のエアを抜きます。またサンプルバルブを使う場合と使わない場合で手順が異なります。

### ～サンプルバルブを使用する場合～

低温環境の場合、P32＜低温室・クロマトチャンバー内でシステムを使用する場合＞をご参照のうえ、Purge用methodを作成してから実行してください。

1. サンプルインレット**S7**に96%エタノールを準備
2. サンプルインレット**S6**に脱気超純水を準備
3. サンプルインレット**S1-5**のいずれかにサンプルを準備
4. サンプルインレット**S6**にサンプルラインのリンス液（バッファーA）を準備
5. 使用するインレットチュービングに、サンプルを充填
   **Manual → Flowpath → SampleValve → S1-5**
   （使用するサンプルバルブのインレットを指定）を選択 → **Execute**
6. **Pump → SampleFlow → 2ml/min → Execute**
   10秒ほど送液（約0.35ml分）、サンプルインレットチュービングをサンプルで満たす
   **End**
7. **File → Instant Run → Use Template**を選択
8. テンプレートより、**Purge Sample Pump**を選択し、**Run**をクリック
9. **Next＞**をクリック
10. **START**をクリック
    **「7.5.3 サンプル準備」（P.34）へ**

### ～サンプルバルブを使用しない場合～

1. サンプルインレットチュービングに脱気超純水を準備
2. **Manual → Flowpath → InjectionValve→ Waste→ Execute**
3. **Manual → Pump → SampleFlow → 10ml/min（5ml/min）* → Execute**
   約1分間（2分間）送液後、**Pause**
4. サンプルインレットチュービングを96%エタノールのボトルに移す。
   **Manual → Pump → SampleFlow → 50ml/min（25ml/min）** → Execute → Continue**
   約2分間（4分間）送液後、**Pause**
5. サンプルインレットチュービングを脱気超純水のボトルに戻す。
6. **Manual → Pump → SampleFlow → 1 ml/min → Execute → Continue**
   5分間送液
7. **Manual → Pump → SampleFlow → 10ml/min（5ml/min）→ Execute**
8. 3分間（6分間）送液後、**End**
   **「7.5.3 サンプル準備」（P.34）へ**

* （ ）内は、低温室、クロマトチャンバー内にてシステムを使用する際の数値です。
** サンプルインレットチュービングS1-S8に、テフロン内径 0.75mm（納品時標準配管）をご使用になる場合、この数値は**10ml/minを適用**してください。これ以上の流速でP-950ポンプを作動させると、ポンプ内にエアが発生する恐れがあります。

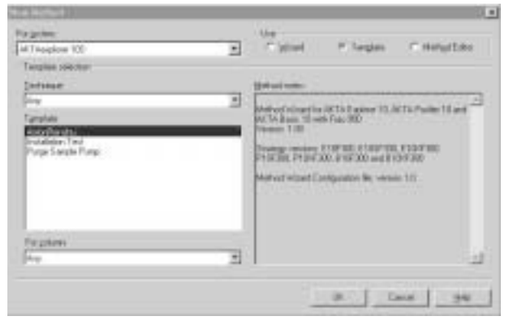
### Purge Sample Pumpメソッドとは？

ポンプのエア除去に必要な工程を盛り込んだテンプレートです。サンプルバルブを使用して実験を行う場合、ご利用頂けます。このテンプレートを使って作成した自動パージメソッドを実行させるためには、S6を超純水、S7 を96%エタノールの専用ラインとして確保する必要があります。
このテンプレートは、操作環境を室温と想定して作成されています。
尚、低温環境で使用される場合、次ページ「低温室・クロマトチャンバー内でシステムを使用する場合」に沿って、メソッドを変更する必要があります。

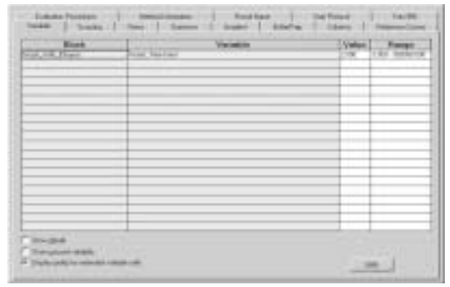
## ◆メソッド作成方法

1. タスクバーの**Method Editor**をクリックします。メニューバーより、
   **File** ↓ **New**

2. **New Method**より**Use** ↓ **Template**を選択
   **Template；Purge Sample Pump**を選択



3. **OK**ボタンをクリックします。



4 **File** ↓ **Save As...**でメソッド名をタイピングし、メソッドを保存します。

**＜低温室・クロマトチャンバー内でシステムを使用する場合＞**

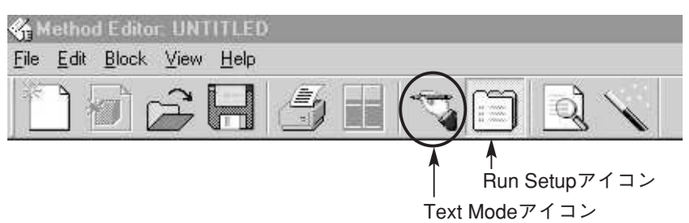
低温環境では、Purge Sample Pumpテンプレートで指定されている流速をそのまま使用することができません。これは液体の送液に必要な圧が室温よりも増加するためです。
そこで、流速を下記のように修正する必要があります。

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Step1 | S6（超純水） | 流速10ml/min | 1分間 | → **流速5ml/min** | **2分間** |
| Step2 | S7（エタノール） | 流速50ml/min | 2分間 | → **流速25ml/min** | **4分間** |
| Step3 | S6（超純水） | 流速10ml/min | 3分間 | → **流速5ml/min** | **6分間** |

## ◆メソッド修正方法

上記の1-3の作業を行った後、

4. **画面上部のアイコンから、Text Modeアイコンをクリックします**
   テキスト編集モードに入ります。





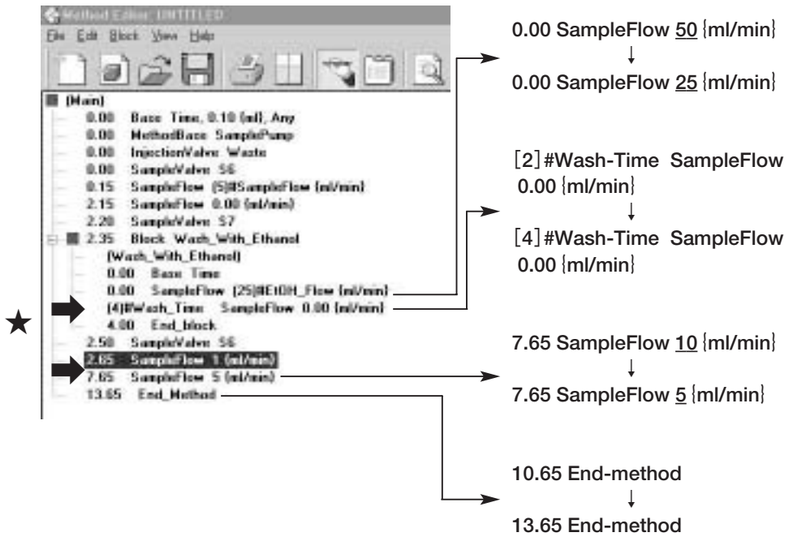

5. **流速（SampleFLow）を変更します**
   流速**SampleFlow**の書かれた行をハイライトし、画面下部**Instruction Box**中の**Parameters**枠内の数値を変更し右端の**Change**ボタンをクリックします。この場合、**SampleFlow**の値を10から5に変更します。
   この際、**Parameters**左の**Var**ボタンをクリックすると、下図の様な**Variable name difinition**ボックスが表示されます。ここへ、例えば“SampleFlow”等とタイピングして**OK**ボタンをクリックすると、Variables面からの変更が簡単に出来るようになります（Variables画面→ P.34 8の図 参照）

0.15 SampleFlow 10 {ml/min}
↓
0.15 SampleFlow 5 {ml/min}

6. **送液時間を変更します**
   続いて次の行（**SampleFlow 0.00 {ml/min}** と書かれた行）をハイライトします。画面下部のBreakPointの枠内の数値を1.15から2.15へ変更し、**Change**ボタンをクリックします。ここでもBreakPointの**Var**ボタンをクリックし、例えば“S6_wash_Vol”等と入力すれば、5､の流速の際と同様、Variables画面からの数値変更が可能になります。

1.15 SampleFlow 0.00 {ml/min}
2.15 SampleFlow 0.00 {ml/min}

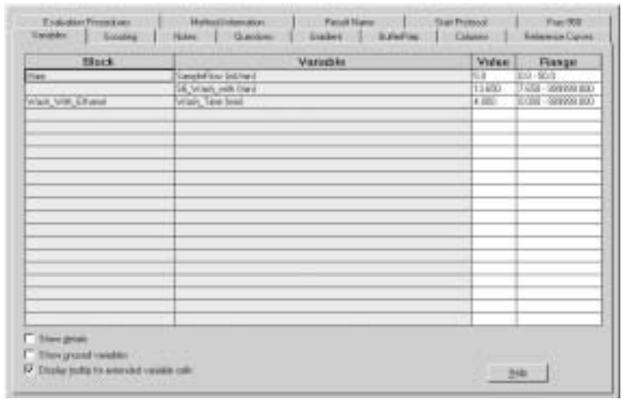
7. **あと2箇所分、5-6の手順で流速と送液時間を変更します**




★ エタノールでの送液時間については、もともとVariables画面での変更ができるようになっています。

注：variable nameには、同じ言葉を複数回使用できません！例えば“SampleFlow1”“SampleFlow2”のように番号を付けるなどして、重複を避けてください。

8. **変更後のVariables画面の例**
Run Setupアイコン（P.32図）をクリックします。
5-7でVariable Nameを入力した分、Variables画面に表示される項目が増えます。




9. **File** ↓ **Save As**でメソッド名を入力します。

### 7.5.3 サンプルの準備

サンプルにサンプルインレットチューブがしっかりセットされていることを確認します。
接続します。
サンプルバルブを使用しない場合（→P.31）は、サンプルインレットチュービングをエアーが入らないように注意深く超純水のボトルからサンプルボトルへ移します。

この配管で使用して実験を行う場合、メソッド作成時の**Injection technique**は
**Sample Pump Direct Loading**
を選択します。

## 7.6 P-950のマニュアルパージ法

マニュアルパージ口のついたP-950では、エア除去をマニュアル操作（手操作）にて行うことも可能です。

注：マニュアルパージを行うには、Purge Kit P-950（専用シリンジとチュービング及びコネクターのセット）が必要です。マニュアルパージ口のついたP-950にのみ添付されています。

注：脱気した液をお使いください。

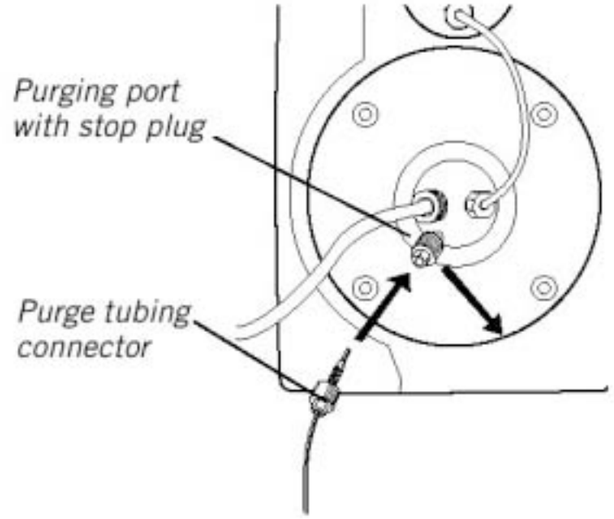
注：P-950内部を超純水に置き換えてから行ってください。

1. **Injection Valve Position**を下記のように切り替えてください。
**Manual** ↓ **Flowpath** → **InjectionValve** →
**（InjectionValve Position）** → **Execute**

| P-950配管 | Injection Valveポジション |
|---|---|
| A；サンプルループへの自動サンプル充填 | Load |
| B；スーパーループへの自動サンプル充填 | Inject |
| C；カラムへのサンプル直接添加 | Waste |



2. P-950のインレットチュービングに超純水が満たされていること、P-950インレットには充分量の超純水が準備されていることをご確認ください。




3. マニュアルパージ口からストッププラグを取り外してください。

4. パージチュービングコネクターをパージ口に取り付けてください。

5. 5mlのシリンジに96%エタノールを吸い上げ、シリンジから空気を抜いてください。

6. シリンジをパージチュービングのルアーコネクターに取り付けてください。

7. マニュアルパージ口に取り付けたパージチュービングコネクターをゆるめ、シリンジからゆっくり少量のエタノールを押し出します。これでパージチュービングまでの空気を除去します。

注：このときパージチュービングコネクターは必ずゆるめてください。

8. P-950を 流速5 ml / min で作動させます。
**Manual** ↓ **Pump** → **SampleFlow** → **5 ml/min** → **Execute**
液が流れ始めたら、マニュアルパージ口のパージチュービングコネクターをしっかりと締めます。

9. 送液を続けながら、シリンジ内のエタノールをゆっくりと押し込みます。

10. エタノールを注入しきったら、パージチュービングコネクターを取り外してパージ口にストッププラグを取り付けます。

11. **System Control**画面で**End**ボタンをクリックし、P-950を停止します。

# 8. フラクションコレクターの準備

フラクションコレクターFrac-900をご使用の場合は、P.40 8.2 Frac-900の場合をご参照ください。

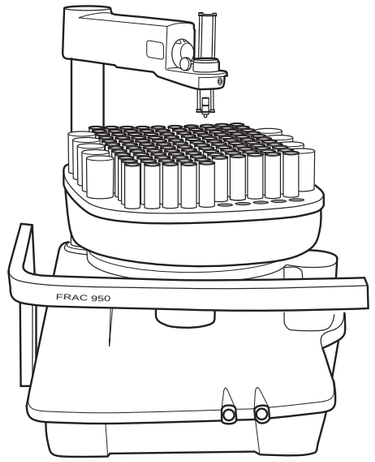
## 8.1 Frac-950の場合

Frac-950では、フラクションの確実な回収のため次の機能を備えています。

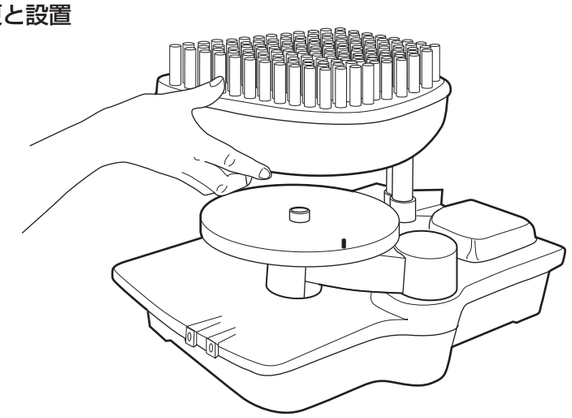
- 時間または容量モードでのフラクション回収
- 容量分取またはピーク分取
- 使用する流速に応じて、ドロップシンクロナイゼーションまたはアキュムレーターによる的確な分取※

※ドロップシンクロナイゼーション；**流速2ml/minまで**に対応。
ドロップセンサーにより滴が落ちたことを感知。その直後にチューブ送りフラクションの回収漏れを防ぐ機能。

アキュムレーター；**流速2～100ml/minまで**に対応。
アキュムレーターにより、チューブ交換時のフラクションを一時的に吸い上げ、次のチューブに回収する機能。




### 8.1.1 チューブホルダーの変更と設置



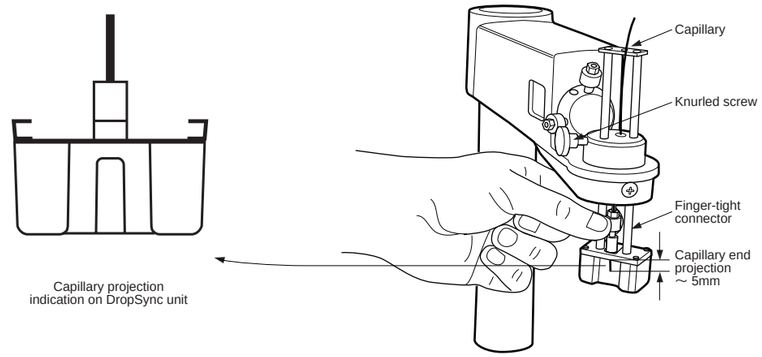
Keying guideをラック裏面の溝に合わせて置いてください。マグネットで固定されます。
ラックを外す際は、ラックを両手で持ち上げます。



### 8.1.2 配管

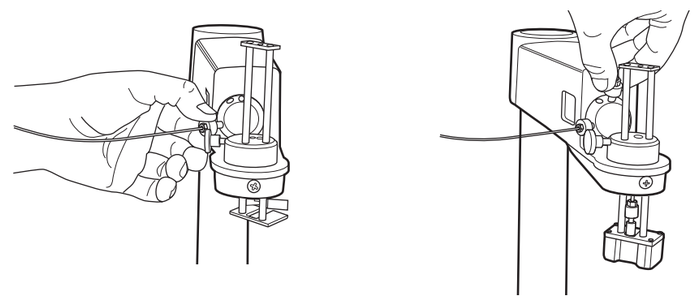
**・流速2ml/min以下で使用するとき**
（Accumulatorを使用しない、TubeまたはDropモード）

1. **OutletValveF2**チュービングを、図のようにAccumulatorを通さずに直接ドロップシンクロユニットに接続してください。
2. フィンガータイトコネクターの先端からチュービングが5mm突出しているように調整してください。
3. Knurled screwを緩め、ドロップシンクロユニットを上下させ試験管にあたらない高さに調整してください。




**・流速2ml/min以上で使用するとき**（Accumulator使用）

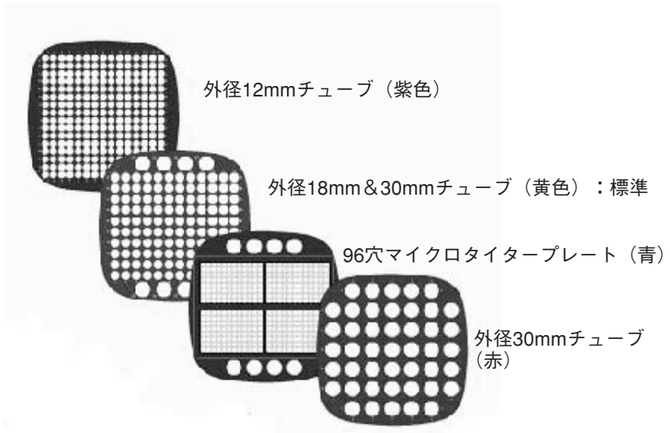
1. **OutletValveF2**チュービングを、下図（左）のようにバルブマニホールドの**lower port**に接続してください。
2. 内径0.75mm（緑色）、長さ250mmのチュービングをバルブマニホールドの**upper port**とドロップシンクロユニットの間に接続してください（下図右）。



3. フィンガータイトコネクターの先端からチュービングが5mm突出しているように調整してください。
4. Knurled screwを緩め、ドロップシンクロユニットを上下させ試験管にあたらない高さに調整してください。

### 8.1.3　ラックの選択

ラックは、設定したいフラクションサイズと使用する流速を基準に選択します。下記A,B,Cの分類は、おおまかな選択の目安としてご覧ください。




注：18mm＆30mmラック（黄色）以外はオプションになります。

**A．流速 数10～100ml/min、フラクションサイズ 数ml～　のとき**

選択肢は下記のようになります。

| ラック | 使用できる試験管 |
|---|---|
| ・18mm（Yellow） | ……外径18mmの試験管<br>例＞15mlサイズのファルコンチューブ等※2 |
| ・30mm（Red） | ……外径30mmのチューブ<br>例＞50mlファルコンチューブ等 |
| ・またはバルブフラクション（フラコレは使用しない） | |

このとき、次項8.1.4　DropSyncro/Accumulatorの選択で**Accumulator**を指定します。

**B．流速 ～数10ml/min、フラクションサイズ～10数ml　のとき**

選択肢は下記のようになります。

| ラック | 使用できる試験管 |
|---|---|
| ・18mm（Yellow） | ……外径18mmの試験管※2<br>例＞15mlサイズのファルコンチューブ等 |
| ・12mm（Violet） | ……外径12mmの試験管<br>例＞スクリューキャップ型1.5mlチューブ、 |

このとき、流速が2ml/min以下であれば次項8.1.4　DropSyncro/Accumulatorの選択で**DropSyncro**を、2ml/min以上であれば**Accumulator**を指定します。

**C．流速 ～数ml/min、フラクションサイズ～数ml　のとき**

選択肢は下記のようになります。

| ラック | 使用できる試験管 |
|---|---|
| ・18mm（Yellow） | ……外径18mmの試験管<br>例＞15mlサイズのファルコンチューブ※2等 |
| ・12mm（Violet） | ……外径12mmの試験管<br>例＞スクリューキャップ型1.5mlチューブ、 |
| ・96-well Plate（Blue） | …96穴マイクロタイタープレート※1 |



このとき、流速が2ml/min以下であれば次項8.1.4　DropSyncro/Accumulatorの選択で**DropSyncro**を、2ml/min以上であれば**Accumulator**を指定します。

※1：推奨プレートGreiner high 780201　Nunc low 156545　Greiner PP Masterblack 2ml 96well 780270
※2：自立型のファルコンチューブ（底が平らなもの）は使用できません。先の細くなっているものを使用してください。

### 8.1.4　DropSyncro/Accumulatorの変更・選択

使用する流速にしたがって、チューブ送りのタイミングを設定します。
DropSyncro、Accumulator、またはTube※を、下図の手順で設定してください。
※Tubeとは、DropSyncro、Accumulator設定をOFFにした状態です。

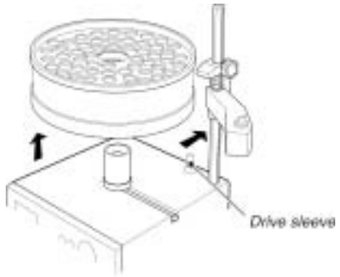
ドロップシンクロナイゼーション機能　……2ml/min 以下
アキュミュレーター機能　……2ml/min 以上

**System Control**モードより
**System**　↓　**Settings**　→　**Specials**　→　**Tube Change**で選択

## 8.2 Frac-900の場合

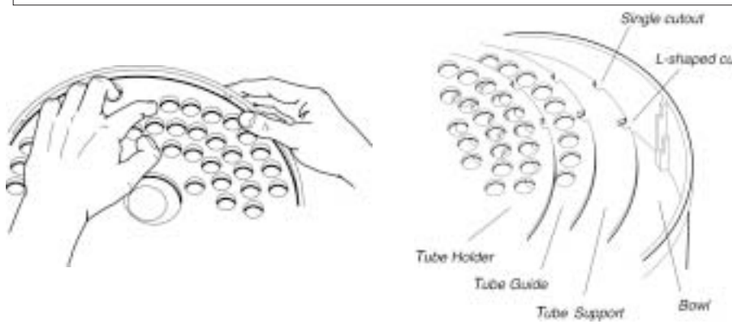
1. ドライブスリーブを後方に引きながら、チューブラックを取り外します。

> 注：チューブラックを回す際も、ドライブスリーブを後方に引いてください。ドライブスリーブが磨耗するとラックの回転が不正確になります。



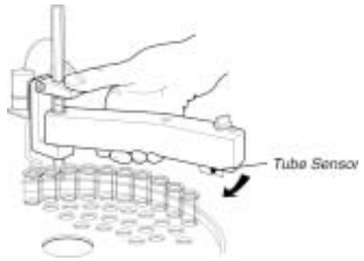

2. 十分な数の同じ長さ・直径の試験管をチューブラックに差してください。長い試験管の場合には、チュー ブサポート（グレーの板）を外すと試験管が安定します。

> 注：メソッドの途中で試験管が不足すると、自動的に**Pause**状態になり、エラーが表示されます。必要な数の試験管を追加して、**Continue**をクリックして下さい。



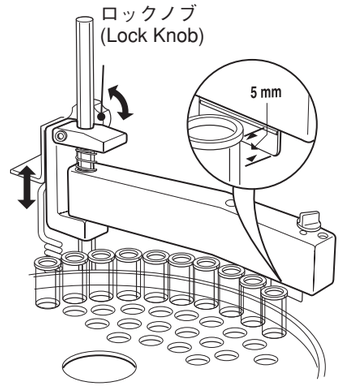

3. チューブラックを、フラクションコレクターにセットします。

4. デリバリーアームを軽くにぎり、少し上にひき上げた様にして、チューブセンサーを試験管に接触します。チューブセンサーが1番目の試験管の外側に触れるように、ドライブスリーブを後方に押しながらラックを回転させます。

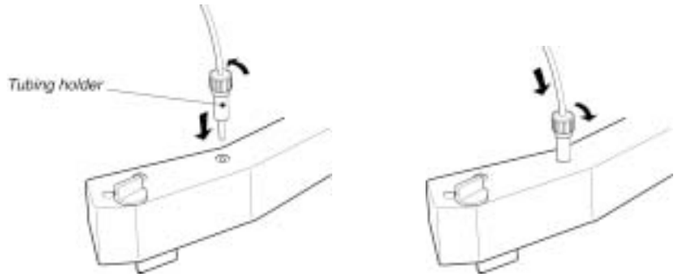




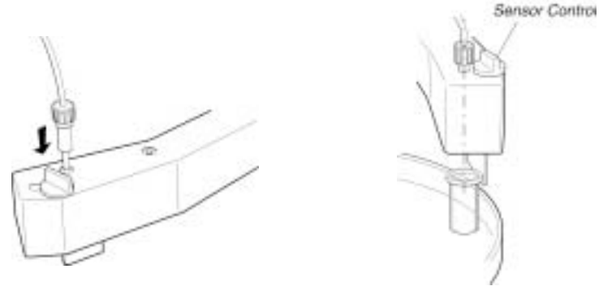

5. ロックノブを緩めて、試験管の上端がチューブセンサーの水平ラインより5 mm下になるようにアームの高さを調節します。



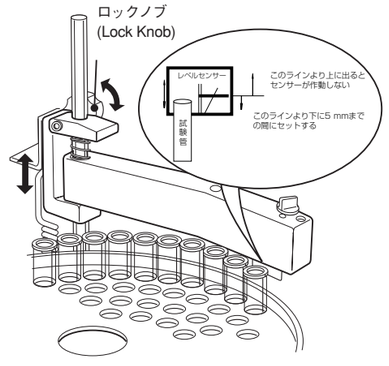

6. チュービングホルダーから突出するPEEKチューブの長さを5 mmに調節します。デリバリーアームの小さなガイド孔を利用すると簡単に調節できます。




7. チュービングホルダーをデリバリーアームに差し込み、センサーコントロール（赤いつまみ）でPEEKチューブの出口が試験管の中央になるようにセットします。




8. 1本目の試験管にチューブセンサーを調節します。試験管がチューブセンサーの中央の縦線よりも後方に接するようにセットします。



# 9. メソッドの作成

## 9.1　ウィザード形式でのメソッド作成

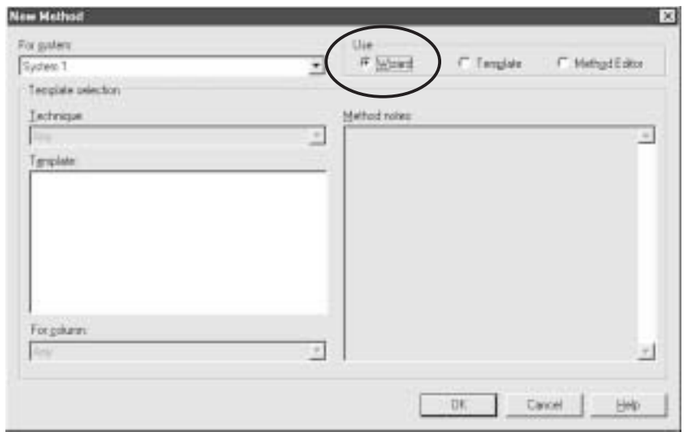
**Wizard**では、
クロマトグラフィー手法・カラム選択
スタート時のシステム値設定
カラム平衡化条件
サンプルインジェクション方法
フラクションの分画方法
溶出プログラム
溶出後のカラム洗浄方法
カラムの再平衡化
といったすべてのステップの設定ができます。これらの設定はクロマトグラフィーの手順に添って1ページずつ表示されますので、簡単にメソッドを作成することができます。

### ウィザード形式でのメソッド作成ガイドライン

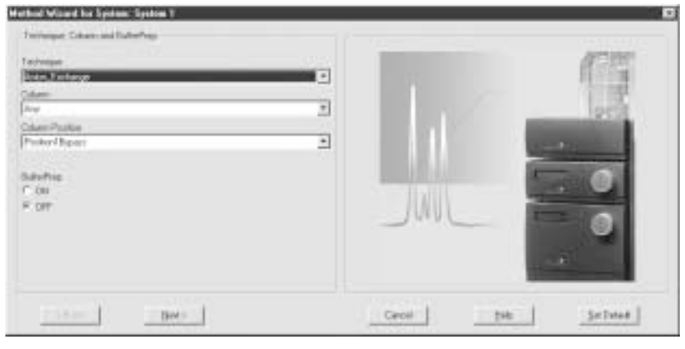
1. **メソッド作成 〜 Wizard 画面の表示**

・タスクバーの**Method Editor**をクリックし、メソッド作成画面を表示します。

・メニューバーより
**File** ↓ **New**を選択し、**New Method**ウインドウを開きます。
**Wizard**を選択し、**OK**ボタンをクリックします。




2. **クロマトグラフィー手法・カラム等の設定**






**Technique**　クロマトグラフィー手法を選択します。

| | |
|---|---|
| Affinity | アフィニティークロマトグラフィー |
| Anion Exchange | 陰イオン交換クロマトグラフィー |
| Cation Exchange | 陽イオン交換クロマトグラフィー |
| Chromatofocusing | クロマトフォーカシング |
| CIP | カラム洗浄（メソッド作成では選択しません） |
| HIC | 疎水性相互作用クロマトグラフィー |
| RPC | 逆相クロマトグラフィー |
| Size Exclusion | ゲルろ過クロマトグラフィー |

**Column**　使用するカラムを選択します。

注：使用するカラムがカラムリストに含まれない場合は、「20.2　カラムリストの追加」の手順でカラムリストに追加できます。

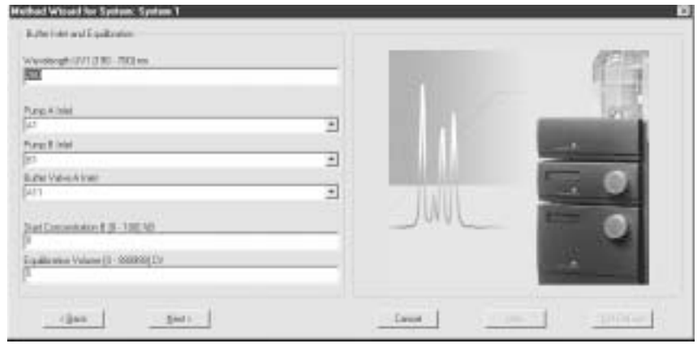
**Column Position**　カラムを接続したカラム選択バルブポジションを選択します。

**BufferPrep**　バッファープレップのON, OFFを選択します。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

3. **スタート条件の設定**

・ここでは、装置の初期設定条件を入力します。




**Wavelength UV1**　測定する波長のうち、第1波長を設定します。
（ピーク分取する場合ここで設定した波長に対して、ピーク分取します）
（第2、第3波長は後述の9項 Variables画面で設定）

**Pump A, BのInlet**　使用するインレットを指定します。
初期値はA1、B1です。

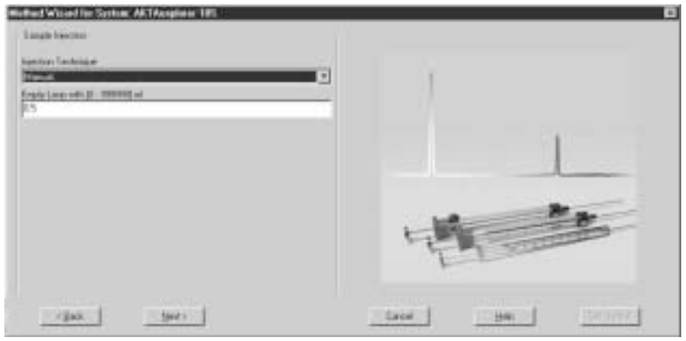
**Buffer Valve A Inlet**　A1のバッファーバルブインレットを指定します。
初期値はA11です。

**Start Concentration B**　開始B% 濃度を入力します。初期値は0%です。

**Equilibration Volume**　カラム平衡化に使用するバッファー量をCV単位（カラム体積）で入力します。一般的な目安は3〜5CV程度です。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

4. **サンプルの添加方法の設定**



**Injection Technique**　サンプルの添加方法を選択します。

| | |
|---|---|
| **Manual** | サンプルループまたはスーパーループへサンプルを手動で充填 |
| **Sample Pump Direct Loading** | P-950を使用してカラムへサンプルを直接添加 |
| **Sample Pump Loop Filling** | P-950を使用してサンプルループまたはスーパーループへサンプルを自動充填 |
| **System Pump Direct Loading** | システムポンプを使用してサンプルをカラムへ直接添加 |

・**Injection Technique**で**Manual**を選択した場合

**Empty Loop with**　バッファーの添加量を入力します。

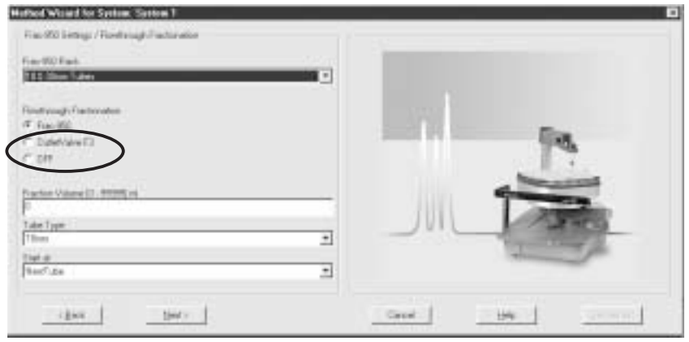
・一度に全量を添加する場合は、サンプルループ体積の3倍量※を入力

・同一サンプルでスカウティングする場合は、1回分の注入量を入力

※ゲルろ過の場合はサンプルループ体積の1.2倍量を入力

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

5. **フラクションコレクターのセッティングと素通り画分回収の設定**
**＜Frac-950の場合＞**



・**Frac-950 Rackの選択**

| | |
|---|---|
| **18 & 30mm Tubes** | （イエロー、標準装備） |
| **12mm Tubes** | （バイオレット） |
| **30mm Tubes** | （レッド） |
| **MicroPlates&30mm Tubes** | （ブルー） |



・**Flowthrough Fractionation**（素通り画分の分取方法）

| | |
|---|---|
| **Frac-950** | Frac-950で分取 |
| **Outlet Valve F3** | アウトレットバルブポート3（F3）から一括回収 |
| **OFF** | 回収しない |

・さらに下の3項目の設定をします。

| | |
|---|---|
| **Fraction Volume** | フラクションサイズ(ml)の設定 |
| **Tube Type** | 18mmチューブ か 30mmチューブを選択 |
| **Start at** | 分取開始のチューブ位置の設定 |
| **NextTube** | 前回分取した最終チューブの次のチューブよりスタート |
| **FirstTube** | 指定したラックの1本目のチューブよりスタート |

**＜Frac-900の場合＞**

・**Flowthrough Fractionation**（素通り画分の分取方法）

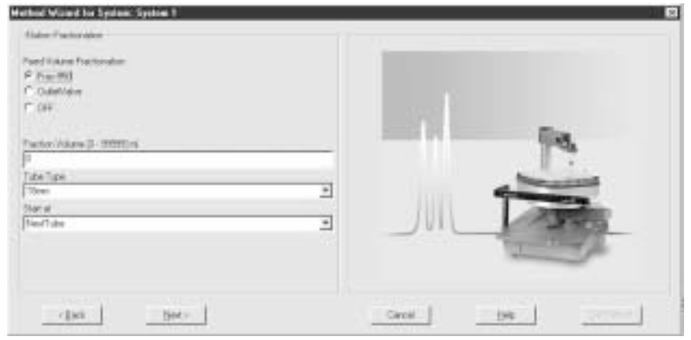
| | |
|---|---|
| **Frac-900** | Frac-900で分取 |
| **Outlet Valve** | アウトレットバルブポート3（F3）から一括回収 |
| **OFF** | 回収しない |

・さらに下の項目を設定

| | |
|---|---|
| **Fraction Volume** | フラクションサイズ（ml）の設定 |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

6. **Elution Fractionation（溶出画分の回収）に関する設定**
**＜Frac-950の場合＞**



・**Fixed Volume Fractionation**（定量フラクションの分取方法）

| | |
|---|---|
| **Frac-950** | Frac-950で分取 |
| **Outlet Valve** | アウトレットバルブを使用した分取 |
| **OFF** | 回収しない |

・さらに下の3項目を設定

**Fraction Volume**　フラクションサイズ(ml)を設定
**Tube Type**　18mm か 30mmを選択
**Start at**　分取開始のチューブ位置の設定
　**NextTube**　前回分取した最終チューブの次のチューブよりスタート
　**FirstTube**　指定したラックの1本目のチューブよりスタート

**Frac-950 のElution Fractionation の推奨設定**
・18&30mm Tube の18mmチューブでFlowthrough画分を回収する場合、Elution FractionationのStart atは**NextTube**
・18&30mm Tube の30mmチューブでFlowthrough画分を回収する場合、Elution FractionationのStart atは**FirstTube**

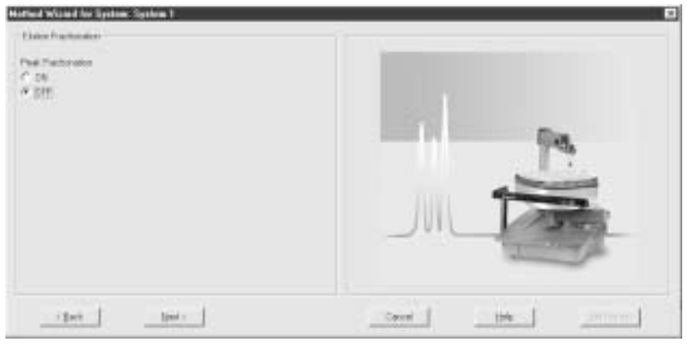
**＜Frac-900の場合＞**

・**Fixed Volume Fractionation**（定量フラクションの分取方法）
**Frac-900**　Frac-900で分取
**Outlet Valve**　アウトレットバルブを使用した分取
**OFF**　回収しない

・さらに下の項目を設定
**Fraction Volume**　フラクションサイズ（ml）を設定

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

7. **溶出液のPeak Fractionation設定**
ピークを自動的に認識して、ピーク成分だけを回収するための設定です。

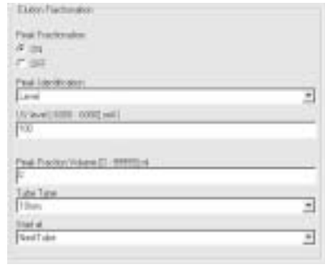


**Peak Fractionation**　ON, OFFを選択します。

・ONを選択すると、さらに別のウィンドウが開きます。



**＜Frac-950の場合＞**



**Peak Identification**（ピークの認識方法）
**Level**方式　一定以上の高さのピークだけを認識するようにUV Level（閾値）を設定
**Slope**方式　ピークスタート、ピークエンドの傾き（スロープ）を入力してピークを認識するように設定。各スロープ値はVariables画面で設定（↓本章9項参照）

・さらに下の3項目を設定
**Peak Fraction Volume**　フラクションサイズ(ml)を設定
**Tube Type**　18mm か 30mmを選択
**Start at**　分取開始のチューブ位置の設定
　**NextTube**　前回分取した最終チューブの次のチューブよりスタート
　**FirstTube**※　指定したラックの1本目のチューブよりスタート

注：**Flowthrough Fraction**又は**Segmented Gradient**で、**FirstTube**を設定したフラクションサイズを**0**とした場合、この**Segment**の**FirstTube**設定は無効になります。フラクションサイズを入力したところの**Start at**で**FirstTube**を指定して下さい。**Variables**画面の**Show detail**をチェックすると、設定できます。

**＜Frac-900の場合＞**

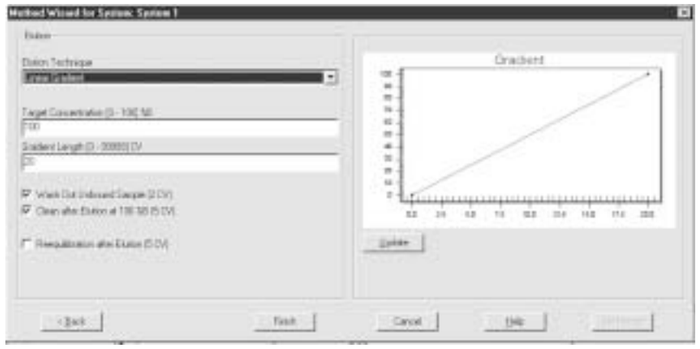
**Peak Identification**（ピークの認識方法）
**Level**方式　一定以上の高さのピークだけを認識するようにUV Level（閾値）を設定
**Slope**方式　ピークスタート、ピークエンドの傾き（スロープ）を入力してピークを認識するように設定
各スロープ値はVariables画面で設定（↓本章9参照）

・さらに下の項目を設定
**Peak Fraction Volume**　フラクションサイズ(ml)を設定

**推奨設定**
・**Peak Fractionation**を**ON**にする場合は、**Fixed Volume Fractionation**（定量フラクション）との併用をお薦めします。前画面の定量分画の設定も必ず行ってください。併用すれば万一、必要なピークが設定したピーク認識パラメータを満たすものではなかった場合でも、定量分画の設定がされていれば廃液されることはありません。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

## 8. Elution（溶出方法）の設定



・**Elution Technigue**

| | |
|---|---|
| **Isocratic** | ゲルろ過クロマトグラフィーのように単一溶媒で溶出する場合。サンプル添加直後から、溶出液を回収。（脱塩など） |
| **Isocratic with Delayed Fractionation** | ボイド部分を分取しないゲルろ過クロマトグラフィーの場合。 |
| **Linear Gradient** | シンプルな一段階のリニアグラジエント |
| **Segmented Gradient** | 多段階グラジエント |

注！：疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）を行う場合、必ず**Segmented Gradient**をお選びください。

・**Linear Gradient**を選択した場合

| | |
|---|---|
| **Target Concentratin%B** | グラジエントの到達 B% |
| **Gradient Length CV** | 到達 B%までのボリューム（CV:カラムボリューム） |

・洗浄の初期設定

| | |
|---|---|
| **Wash Out Unbound Sample**（非吸着画分の洗浄） | 2 CV |
| **Clean after Elution at 100 %B**（溶出後のカラム洗浄） | 5 CV（フラクション回収はしません） |

必要ない場合チェックを外してください。
Wizard設定が終了した時点で作成されるVariables画面でも変更できます。

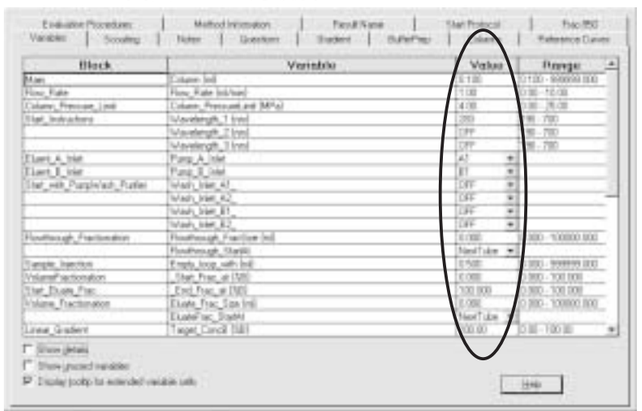
・再平衡化の設定

| | |
|---|---|
| **Reequilibration**（カラムの再平衡化） | 5 CV |

必要な場合にチェックを入れます。

設定終了後、**Finish**ボタンをクリックします。続いて**Variables**画面が表示されます。

## 9. Variables画面での入力項目



・**Wizard**で設定した数値は、このような**Variables**画面で確認することができます。
・変更したい値があれば、表の中の**Valueセルをダブルクリック**して値を変更できます。

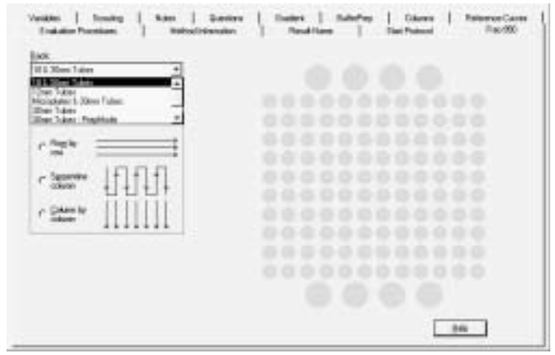


＜**Variables**画面での主な変更・チェック項目＞
・**Wavelength**（第2、第3波長の設定）
・**Wash Out Unbound Sample**（非吸着画分の洗浄）の体積※
・**Clean after Elution at 100 %B**（溶出後のカラム洗浄）の体積※
・**Reequilibration**（カラムの再平衡化）の体積※
・**PeakFrac Parameters**（Slope方式でピークフラクションを設定した場合のSlope値）等
※これらの項目は、**Variables**画面下方の**Show details**ボックスにチェックをすると表示されます。

## 10. Run Set upの他のページでの確認項目

### ＜Frac-950＞ページ

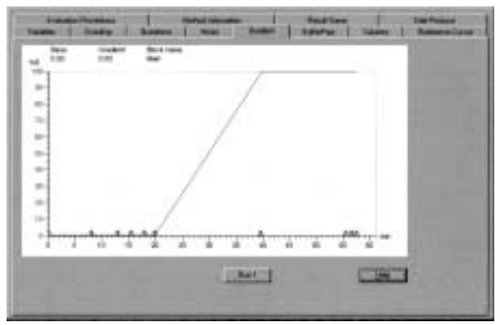
・Frac-950 の分取条件設定



| | |
|---|---|
| **Rack** | ここで選択されているラックが、Wizardで設定したラックと一致しているか確認します |
| **Fraction order** | 分取の方向（縦横計4種の中から選択） |

### ＜Gradientのページ＞

・グラジエントカーブが表示されます。
各ブロックの長さは、グラフの下にマークされます。X軸をクリックすると、ベース（時間、ボリューム、カラムボリューム）の変更ができます。

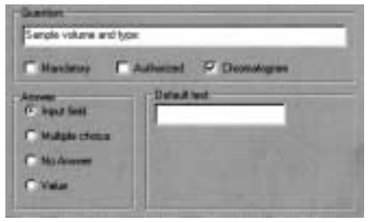


### ＜Questionsのページ＞

・サンプル名、サンプル添加量、使用カラム名、バッファーなどを保存することができます。

・入力のしかた

1. 入力する項目（例：**No.1 Sample volume and type**）をクリックします。



2. **Default text**のセルをクリックし、カーソルが表示されたらキーボードより入力します。

3. **Replace**をクリックし、入力したテキストを登録します。

4. 以上を繰り返します。

＜Start protocolのページ＞

・ここでは、メソッド実行前に確認する項目の選択ができます。確認したい項目のチェックボックスをマークしてください。

注）Method Queueを実行する場合はすべてチェックをはずして下さい。

◆Start protocolの項目

・**Variables**
メソッド実行前に、メソッドの内容の確認及び変更ができます。変更内容はResultファイルに保存されますが、元のメソッドの内容の書き換えは行なわれません。

・**Scouting**
スカウティングの内容の確認、変更ができます。変更内容はResultファイルに保存されます。

・**Text Method**
メソッドの内容がテキストで表示されます。ここでは、メソッドの内容変更はできません。

・**Questions**
サンプル、カラム、バッファーなどの情報の確認、保存ができます。

・**Notes**
メモ（記録に残したい情報）の確認、保存ができます。

・**Gradient**
グラジエントカーブの確認ができます。

・**BufferPrep**
選択したBufferPrepのレシピの確認ができます。



・**Columns**
選択したカラムの情報（ベットボリューム、流速、耐圧など）を確認できます。

・**Reference curves**
比較したいカーブを表示することができます。ここでは、比較するカーブの追加、削除、改名が出来ます。指定したカーブはメソッド実行中、System Controlの画面に表示できます。

・**Evaluation procedures**
メソッド終了後自動的に結果のクロマトグラムをプリントアウトできます。

・**Method information**
メソッド情報（メソッド作成日、変更日など）が確認できます。

・**Settings**
システム設定（アラーム設定、モニターやカーブの設定）が確認できます。
変更は、**System → settings**

・**Calibration**
モニターのキャリブレーション設定が確認できます。
変更は、**System Control**より**System → Calibrate**

・**Result name changeable**
メソッド実行時にResult名の変更ができます。保存先のResultフォルダーを変更する場合は**Browse**をクリックします。

・**Scouting start protocol**
スカウティング内容の確認、変更を、最初のメソッド実行時のみ行なうか、各スカウティング毎に行うかを選択できます。

＜BufferPrep＞ページ

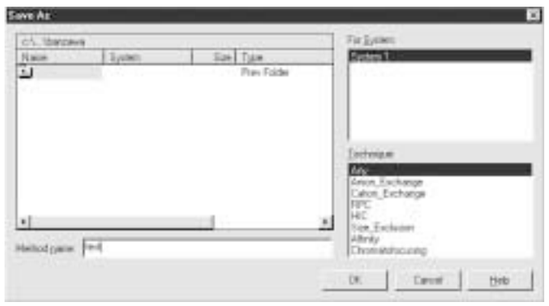
・BufferPrepを行う場合、Wizardで選択したレシピがここでも正しく選択されていることを確認します。

＜Method Information＞ページ

・Method Durationページでメソッドの所用時間、必要バッファー量等が確認できます。

必要な確認を行い、メソッド作成は終了です。

11. メソッドの保存



・**File ↓ Save As...**を選択します。
**Method name** ファイル名を入力します。
**Technique** 手法を選択します。

・メソッドは、この画面で選択したディレクトリに保存されます。

以上を入力・選択後、**OK**ボタンをクリックします。

注：メソッドを実行すると、メソッド名の後に“001”から始まる番号が付いたResultファイルが作成されます。

12. 作成したメソッドの確認・表示

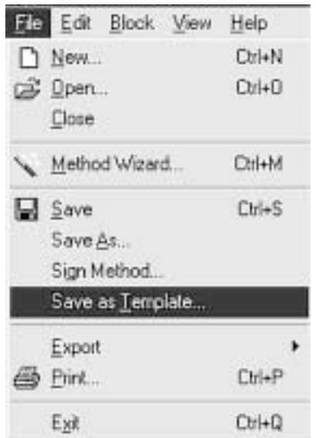
・タスクバーの**UNICORN Main Menu**をクリックします。

Methodsウインドウに、保存されたメソッド名が表示されます。
ファイルを開く場合、この画面のファイル名をダブルクリックします。

## 9.2　作成したメソッドをテンプレートとして保存

タスクバーの**Method Editor**をクリックします。
・Wizard方式でメソッドを作成します（9.1参照）。

・すでにメソッドとして保存している場合は、そのメソッドFileを開きます。
**File　↓　Open...**
・開くファイルを指定し、**OK**ボタンをクリックします。
・テンプレートとして保存します。
**File　↓　Save as Template...**



**Name**　テンプレート名を入力します。
**Technique**　クロマトグラフィー手法を選択し、**OK**をクリックします。

次回からは、メソッド作成方式としてTemplate（9.1.1項参照）を選択し、表示されるVariables画面で必要な箇所のみ数値を変更します。このようにして作成したメソッドは、新たに名前をつけてメソッドとして保存することができます（**File ↓ Save As**）。



# 10. メソッド作成例

## 10.1　ゲルろ過（マニュアルサンプル添加）

下記の条件でのプログラム作成例

| | |
|---|---|
| カラム | Superdex 75 HR 10/30 |
| バッファー | 50mMリン酸ナトリウム（pH7.2）、150mM NaCl |
| 流速 | 0.5 ml/min |
| カラム平衡化 | 2 CV |
| サンプル量 | 0.2 ml |
| 溶出 | 1液による溶出（Isocratic溶出）、1.5 CV |
| 検出 | 280 nm, 254 nm, 214nm |
| カラムポジション | Position 2 |
| フラクション回収 | 1mlずつ分取。12mmラック（バイオレット※）使用<br>※オプション　Frac-950使用。 |

1. **新規メソッドの作成**
・タスクバーの**Method Editor**をクリックし、メソッド作成画面に入ります。
・メニューバーより
**File　↓　New**を選択し、**New Method**ウインドウを開きます。
**Wizard**を選択し、**OK**ボタンをクリックします。

2. **クロマトグラフィー手法、カラム等の設定**

| | |
|---|---|
| **Technique** | Size Exclusion |
| **Column** | Superdex 75 HR 10/30 |
| **Column Position** | Position 2 |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

3. **スタート条件の設定**

| | |
|---|---|
| **Wavelength UV1**（第1波長） | 280 nm<br>第2、第3波長はVariables画面で設定（後述、9項参照） |
| **Pump A Inlet** | A1 |
| **Pump B Inlet** | B1（この場合実際には使用しません） |
| **Buffer Valve A Inlet** | A11 |
| **Start Concentration B** | 0 %B（Aポンプのみ使用します） |
| **Equilibration Volume** | 2（ゲルろ過クロマトグラフィーでは一般に、分離で使用するバッファーでの平衡化は 2 CV以上行います） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

4. **サンプル添加方法の設定**

| | |
|---|---|
| **Injection Technique** | Manual（シリンジを使った、ループへの手操作でのサンプル充填） |
| **Empty Loop with** | 0.3 ml（確実にサンプルが添加されるように余裕をもって入力） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

**＜Frac-950の場合のみ＞**

5. **Frac-950のセッティング**

| | |
|---|---|
| **Frac-950 Rack** | 12mm Tubes |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

6. **Elute Fractionation（溶出液の回収）に関する設定**

・**Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定）

**＜Frac-950の場合＞**

| | |
|---|---|
| **Frac-950** | Frac-950で回収 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |
| **Tube Type** | 12mm |
| **Start at** | First Tube　（分取開始試験管を指定） |

**＜Frac-900の場合＞**

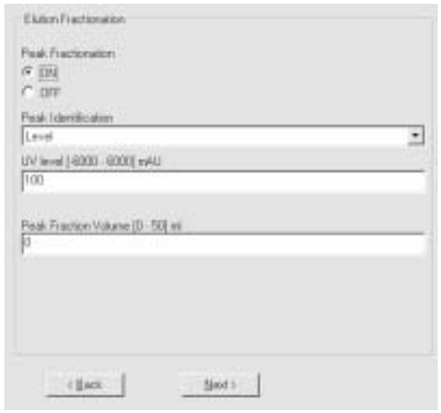
| | |
|---|---|
| **Frac-900** | Frac-900で分取 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |
| **Outlet Valve** | アウトレットバルブ使用した分取 |
| **Off** | 回収しない |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

7. **溶出の間のPeak Fractionationの設定**

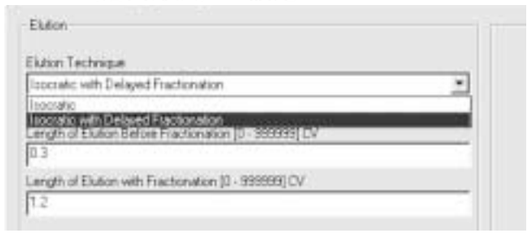
**Peak Fractionation**　OFF*（ピーク分取しない）

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。




*Peak Fractionation ONを選択した場合、ピーク認識用のパラメータ入力が必要です。詳細は9.1の7項を参照）

8. **Elution（溶出方法）の設定**




**Elution Technique**　Isocratic with Delayed Fractionation
（Isocraticはボイド部分も分取）

**Length of Elution Before Fractionation**
0.25 CV（回収しない部分の溶出体積を入力。0.25 CVはボイドボリューム）

**Length of Elution with Fractionation**
1.2 CV（ボイドボリューム後からの溶出体積を入力）

以上を入力し、**Finish**ボタンをクリックします。



9. **Variables画面での入力項目**

・**Wizard**で設定した数値は、**Variables**画面で確認することができます。

・**Wavelength UV2、UV3**（第2、第3波長）や、その他変更したい値があれば、**Valueセルをクリック**し、値を変更します。ON, OFFの変更は**マウス右クリック**、選択肢からの選択は**プルダウンメニュー**から選択、数値の変更は**ダブルクリック→数値入力→Enter**で行います。

＜**Variables**画面での主な変更・チェック項目＞

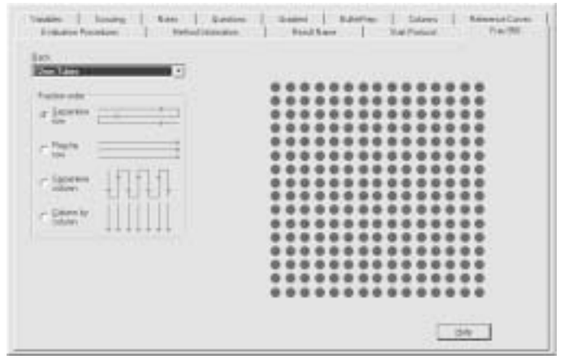
・**Wavelength**（第2、第3波長の設定）

・**PeakFrac Parameters**（Slope方式でピークフラクションを設定した場合のSlope値）*等

*この項目は、**Variables**画面下方の**Show details**ボックスにチェックを入れると表示されます。

**＜Frac-950ご使用の場合のみ＞**

次にVariables画面と並んで表示される画面の中から、「**Frac-950**」ページを選択します。



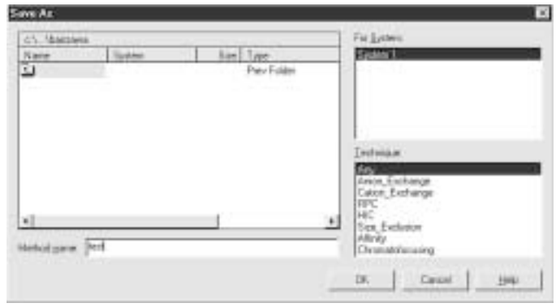
**Rack**　ここで選択されているラックが、Wizardで設定したラックと一致しているか確認します

**Fraction order**　分取の方向（縦横計4種の中から選択）

また「**Method Information**」の**Method Duration**ページでは、メソッドの所用時間、必要バッファー量等が確認できます。

必要な確認を行い、メソッド作成は終了です。

10. **メソッドの保存**




**File　↓　Save As**

**Method name**　ファイル名を入力します

**Technique**　手法を選択します

メソッドは、この画面で選択したディレクトリに保存されます。

> 注：メソッドを実行すると、メソッド名の後に001から始まる番号が付いたものが、Resultファイル名になります。

以上を入力・選択し、**OK**をクリックすると、メソッドが保存されます。

11. **作成したメソッドの確認**
**UNICORN Main Menu**画面のMethodsウインドウに、保存されたメソッド名が表示されます。

## 10.2 イオン交換（サンプルループへの自動サンプル充填）

下記の条件でのプログラム作成例

| | |
|---|---|
| カラム | RESOURCE S 1ml |
| 流速 | 4 ml/min |
| カラム平衡化 | 5 CV |
| 添加サンプル量 | 1 ml |
| 溶出 | 0 -50 %B、20 CV<br>50-100 %B、0 CV<br>100 %B 3 CV |
| 検出 | 280 nm, 254 nm, 214nm |
| カラムポジション | Position 2 |
| フラクション回収 | ＜Frac-950 18&30mm（イエロー）ラック使用＞ |
| 素通り画分 | 素通り画分すべてを1チューブ（50mlチューブ）に回収※ |
| 溶出画分 | 1 mlずつ分取※<br>※Frac-900の場合、素通り・溶出画分とも連続して回収します。 |

1. **新規メソッドの作成**
・タスクバーの**Method Editor**をクリックし、メソッド作成画面に入ります。
・メニューバーより
**File** ↓ **New**を選択し、**New Method**ウインドウを開きます。
**Wizard**を選択し、**OK**ボタンをクリックします。

2. **クロマトグラフィー手法、カラム等の設定**

| | |
|---|---|
| **Technique** | Cation Exchange |
| **Column** | RESOURCE S 1 ml |
| **Column Position** | Position 2 |
| **BufferPrep** | OFF |

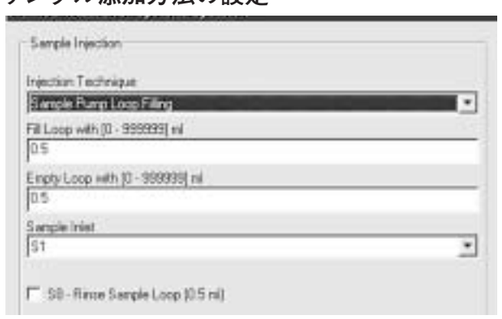
以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

3. **スタート条件の設定**

| | |
|---|---|
| **Wavelength UV1**（第1波長） | 280 nm<br>第2、第3波長はVariables画面で設定（後述、9項参照） |
| **Pump A Inlet** | A1 |
| **Pump B Inlet** | B1 |
| **Buffer Valve A Inlet** | A11 |
| **Start Concentration B** | 0 %B（開始バッファーはAポンプ使用） |
| **Equilibration Volume** | 5 CV（CV=カラム体積。一般的なAバッファーでのカラム平衡化体積の目安は3～5CV程度です。） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

4. **サンプル添加方法の設定**






| | |
|---|---|
| **Injection Technique** | **Sample Pump Loop Filling**<br>（P-950を使った、ループへの自動サンプル充填） |
| **Fill Loop with** | 2 ml（サンプルループ + 85µl以上。余裕を見て入力） |
| **Empty Loop with** | 2 ml（ループ内の共液洗浄のため、実際のループ体積の2-3倍体積分入力します） |
| **Sample Inlet** | S1 |
| **S-8 Rinse Sample Loop（0.5 ml）** | サンプルループ内の洗浄ステップです。1種類のサンプルを添加する場合は必要ありません。 |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

5. **Fracのセッティングと素通り画分回収の設定**
**＜Frac-950の場合＞**

| | |
|---|---|
| **Flowthrough Fractionation** | Frac-950 |
| **Fraction Volume** | 5 ml |
| **Tube Type** | 30 mm |
| **Start at** | First tube |

**＜Frac-900の場合＞**

| | |
|---|---|
| **Flowthrough Fractionation** | Frac-900 |
| **Fraction Volume** | 5 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

6. **Elution Fractionation（溶出画分の回収）に関する設定**
**＜Frac-950の場合＞**
**Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定）
Frac-950

| | |
|---|---|
| **Fraction Volume** | 1 ml |
| **Tube Type** | 18 mm |
| **Start at** | First Tube（分取開始試験管を指定） |

**＜Frac-900の場合＞**
**Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定）
Frac-900

| | |
|---|---|
| **Fraction Volume** | 1 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

7. **溶出液のPeak Fractionation設定**

| | |
|---|---|
| **Peak Fractionation** | OFF（ピーク分取しない） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

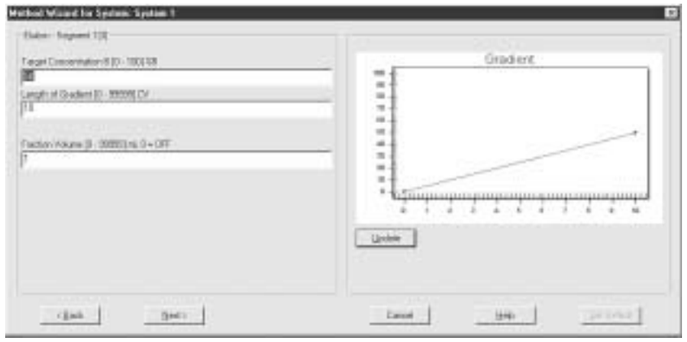
8. **Elution（溶出方法）の設定**

| | | |
|---|---|---|
| **Elution Technique** | Segmented Gradient | |
| **Number of Segments** | 3 | |
| **Wash Out Unbound Sample** | 2CV※ | 非吸着物質の洗浄 |
| **Clean After Gradient** | 5CV※ | グラジエント溶出終了後のConcB100%でのカラム洗浄（フラクション回収はしません） |
| **Reequilibration after Elution** | 5CV※ | ConcB 0%でのカラム再平衡化 |

必要な場合、ボックスにチェックを入れてください。
※これらの数値の変更を行う場合、**Variables**画面にて行います。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

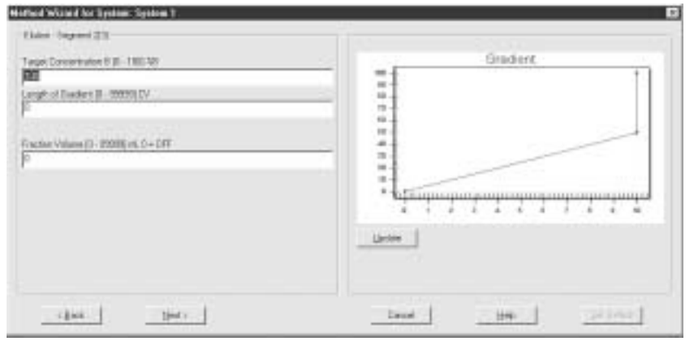
### 8-1. Elution Segment　1（3）（グラジエント）の設定1




| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 50 %B |
| **Length of Gradient** | 20 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

どのような形のグラジエントを描いたか、右図の**Update**ボタンを押すことで確認できます。
以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

### 8-2. Elution Segment　2（3）（グラジエント）の設定2

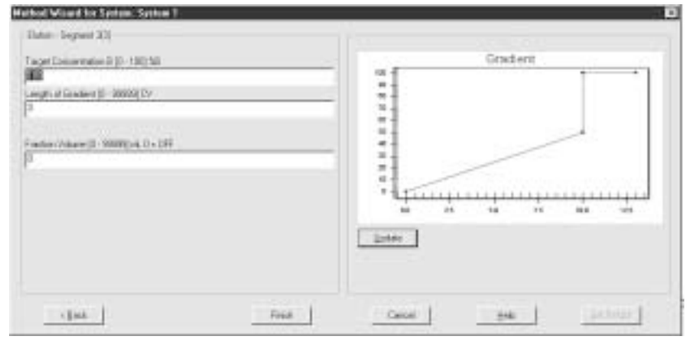



| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100 %B |
| **Length of Gradient** | 0 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。



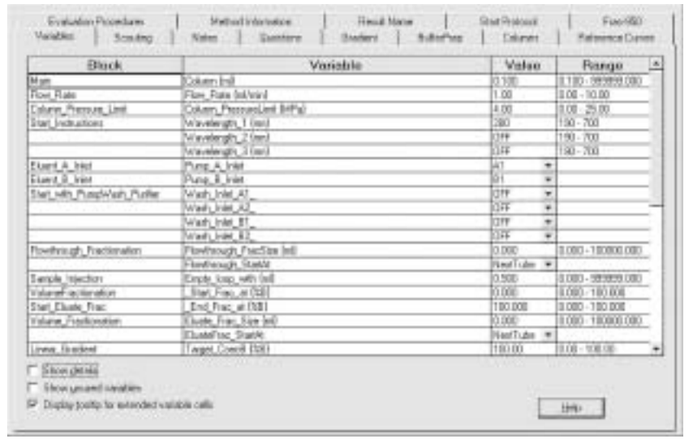
### 8-3. Elution Segment　3（3）（グラジエント）の設定3




| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100 %B |
| **Length of Gradient** | 3 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

以上を選択し、**Finish**ボタンをクリックします。

### 9. Variables画面での入力項目




・**Wizard**で設定してきた数値は、このような**Variables**画面で一覧になります。

・**Wavelength UV2、 UV3**（第2、第3波長）や、その他変更したい値があれば、**Valueセルをクリック**し、値を変更します。ON,OFFの変更は**マウス右クリック**、選択肢からの選択は**プルダウンメニュー**から選択、数値の変更は**ダブルクリック→数値入力→Enter**で行います。

＜**Variables**画面での主な変更・チェック項目＞
・**Wavelength**（第2、第3波長の設定）
・**Wash Out Unbound Sample**（非吸着画分の洗浄）の体積※
・**Clean after Elution at 100 %B**（溶出後のカラム洗浄）の体積※
・**Reequilibration**（カラムの再平衡化）の体積※
※これらの項目は、Variables画面下方の**Show details**ボックスにチェックを入れると表示されます。

**＜Frac-950の場合のみ＞**
次にVariables画面と並んで表示される画面の中から、「**Frac-950**」を選択します。

| | |
|---|---|
| **Rack** | Wizardで設定したラックと一致しているか確認 |
| **Fraction order** | Serpentine row（縦横計4種の中から選択） |

10. メソッドの保存
**File ↓ Save As**

| | |
|---|---|
| **Method Name** | ファイル名を入力します |
| **Technique** | 手法を選択します |

メソッドは、この画面で選択したディレクトリに保存されます。
以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

> 注：メソッドを実行すると、メソッド名の後に“001”から始まる番号が付いたものが、Resultファイル名になります。

11. 作成したメソッドの確認
**UNICORN Main Menu**画面のMethodsウィンドウに、保存されたメソッド名が表示されます。

## 10.3 イオン交換（カラムへのサンプル直接添加）

下記の条件でのプログラム作成例

| | |
|---|---|
| カラム | RESOURCE S 1 ml |
| 流速 | 4 ml/min |
| カラム平衡化 | 5 CV |
| 添加サンプル量 | 100ml |
| 溶出 | 0- 50%B 5 CV |
| | 50-100%B 0 CV |
| | 100 %B 3 CV |
| 検出 | 280 nm, 254 nm, 214 nm |
| カラムポジション | Position 2 |
| フラクション回収 | ＜Frac-950 18&30mm Tubes（イエロー）ラック使用＞ |
| 素通り画分 | 50 mlずつ分取（30mmチューブ）※ |
| 吸着画分 | 1 mlずつ分取（18mmチューブ）※ |
| | ※Frac-900の場合、素通り・溶出画分とも連続して回収 |

1. 新規メソッドの作成
・タスクバーの**Method Editor**をクリックし、メソッド作成画面に入ります。
**File ↓ New**
**New Method**ウインドウで**Wizard**を選択し、**OK**ボタンを押します。

2. クロマトグラフィー手法、カラム等の設定

| | |
|---|---|
| **Technique** | Cation Exchange |
| **Column** | RESOURCE S 1 ml |
| **Column Position** | Position 2 |
| **BufferPrep** | OFF |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

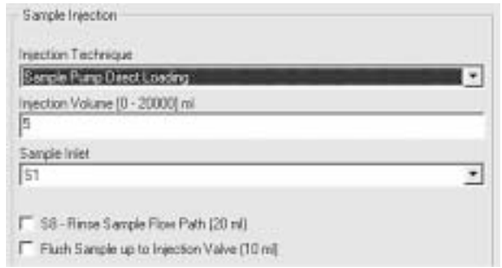
3. スタート条件の設定

| | |
|---|---|
| **Wavelength UV1**（第1波長） | 280 nm |
| 第2、第3波長はVariables画面で設定（後述、9項参照） | |
| **Pump A Inlet** | A1 |
| **Pump B Inlet** | B1 |
| **Buffer Valve A Inlet** | A11 |
| **Start Concentration B** | 0 %B |
| **Equilibration Volume** | 5 CV（CV=カラム体積。一般的なAバッファーでのカラム平衡化体積の目安は3～5CV程度です。） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。



4. サンプル添加方法の設定




| | |
|---|---|
| **Injection technique** | Sample Pump Direct Loading<br>（P-950を使った、カラムへの自動直接サンプル添加） |
| **Injection Volume** | 100 ml |
| **Sample Inlet** | S1 |

**S-8 Rinse Sample FlowPath（20 ml）**は、ラインS8に準備したライン洗浄液（開始バッファー）での、サンプルループ間の共通ラインの洗浄のための項目です。初期設定ではOFFになっていますが、複数サンプルのスカウティングを行う場合のみ、チェックしてください。
**Flush Sample up to Injection Valve（10 ml）**は、サンプルインレットチューブからインジェクションバルブまでの流路の、サンプルでの置換のための項目です。初期設定ではOFFになっています。ONにする（チェックをいれる）と、10mlのサンプルを使ってライン置換をするため、上で入力したInjection Volumeの正確性が向上します。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

5. Fracのセッティングと素通り画分回収の設定
＜Frac-950の場合＞

| | |
|---|---|
| **Frac-950 Rack** | 18&30mm Tubes |
| **Flowthrough Fractionation** | Frac-950 |
| **Fraction Volume** | 50 ml |
| **Tube Type** | 30 mm |
| **Start at** | First tube |

＜Frac-900の場合＞

| | |
|---|---|
| **Flowthrough Fractionation** | Frac-900 |
| **Fraction Volume** | 5 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

6. Elution Fractionation（溶出液の回収）に関する設定
＜Frac-950の場合＞

| | |
|---|---|
| **Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定） | Frac-950 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |
| **Tube Type** | 18 mm |
| **Start at** | First Tube（分取開始試験管を指定） |

＜Frac-900の場合＞

| | |
|---|---|
| **Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定） | Frac-900 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

7. **溶出液のPeak Fractionationの設定**

| | |
|---|---|
| **Peak Fractionation** | OFF（ピーク分取しない） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

8. **Elution（溶出方法）の設定**

| | | |
|---|---|---|
| **Elution Technique** | Segmented Gradient | |
| **Number of Segments** | 3 | |
| **Wash Out Unbound Sample** | 2CV※ | 非吸着物質の洗浄 |
| **Clean After Gradient** | 5CV※ | グラジエント溶出終了後のConcB100%でのカラム洗浄（フラクション回収はしません） |
| **Reequilibration after Elution** | 5CV※ | ConcB 0%でのカラム再平衡化 |

必要な場合、ボックスにチェックを入れてください。

※これらの数値の変更を行う場合、**Variables**画面にて行います。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

8-1. **Elution Segment　1（3）（グラジエント）の設定1**

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 50 |
| **Length of Gradient** | 5 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

どのような形のグラジエントを描いたか、右図の**Update**ボタンを押すことで確認できます。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

8-2. **Elution Segment　2（3）（グラジエント）の設定2**

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100 |
| **Length of Gradient** | 0 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

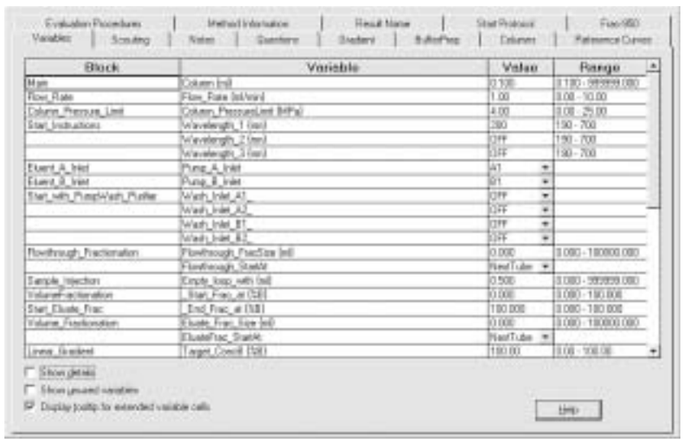
以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

8-3. **Elution Segment　3（3）（グラジエント）の設定3**

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100 |
| **Length of Gradient** | 3 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

以上を選択し、**Finish**ボタンをクリックします。

9. **Variables画面での入力項目**




・**Wizard**で設定してきた数値は、このような**Variables**画面で一覧になります。



・**Wavelength UV2、 UV3**（第2、第3波長）や、その他変更したい値があれば、**Valueセルをクリック**し、値を変更します。**ON,OFF**の変更は**マウス右クリック**、選択肢からの選択は**プルダウンメニュー**から選択、数値の変更は**ダブルクリック→数値入力→Enter**で行います。

＜**Variables**画面での主な変更・チェック項目＞

・**Wavelength**（第2、第3波長の設定）
・**Wash Out Unbound Sample**（非吸着画分の洗浄）の体積※
・**Clean after Elution at 100 %B**（溶出後のカラム洗浄）の体積※
・**Reequilibration**（カラムの再平衡化）の体積※
・**PeakFrac Parameters**（Slope方式でピークフラクションを設定した場合のSlope値）

※これらの項目は、**Variables**画面下方の**Show details**ボックスにチェックを入れると表示されます。

**＜Frac-950の場合のみ＞**

・次にVariables画面と並んで表示される画面の中から、「**Frac-950**」を選択します。

| | |
|---|---|
| **Rack** | Wizardで設定したラック（=18&30mm Tubes）と一致しているか確認 |
| **Fraction order** | Serpentine row（縦横計4種の中から選択） |

10. **メソッドの保存**
**File　↓　Save As**

| | |
|---|---|
| **Method Name** | ファイル名を入力します |
| **Technique** | 手法を選択します |

メソッドは、この画面で選択したディレクトリに保存されます。

> 注：メソッドを実行すると、メソッド名の後に“001”から始まる番号が付いたものが、Resultファイル名になります。

以上を選択し、**OK**をクリックします。

11. **作成したメソッドの確認**
**UNICORN Main Menu**画面の**Methods**ウィンドウに、保存されたメソッド名が表示されます。

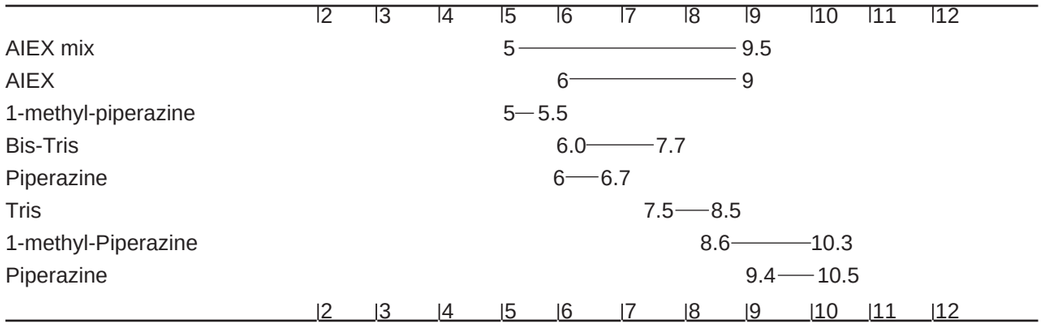
# 11. メソッド作成（応用）

## 11.1　BufferPrep機能

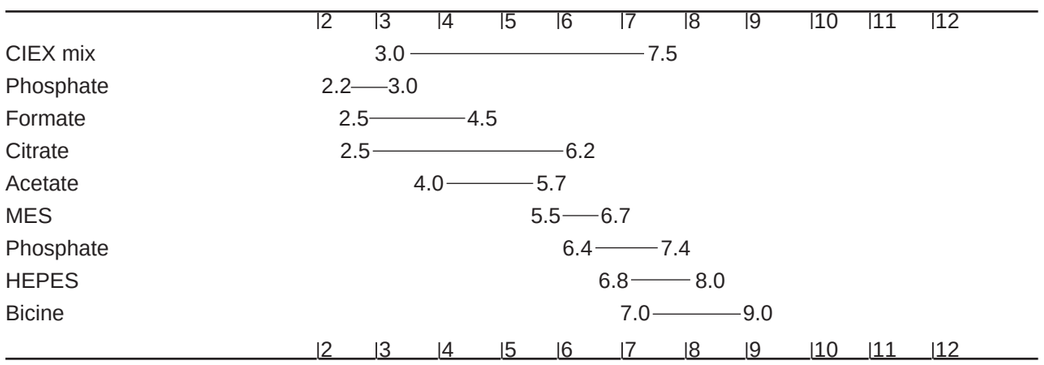
イオン交換の際、バッファーの至適pHを検討することは大変有効です。バッファーのpHを変えるだけで、分離できなかったものが分離する場合もあります。

UNICORNには、条件検討したいpH範囲によって、どの試薬を用意すればいいか、下記に示すようなpH範囲のバッファー調製法（レシピ）が組み込まれています。

### 陰イオン交換クロマトグラフィー用バッファー

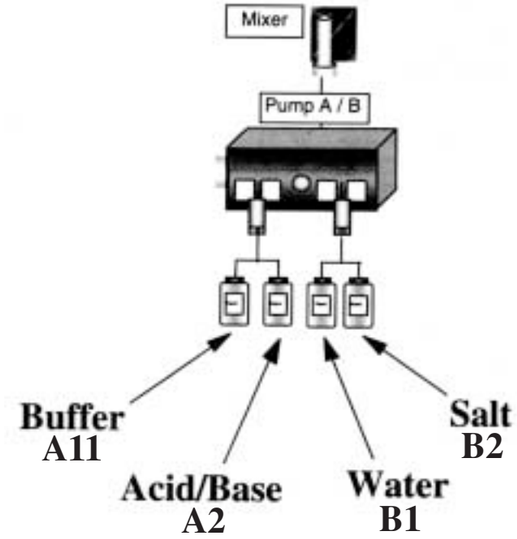



### 陽イオン交換クロマトグラフィー用バッファー






用意するのは、バッファーのストック溶液、pH滴定用のHCl（またはNaOH）、NaCl溶液、超純水の4つだけで、pH調製の必要はありません。各溶液は図のように接続します。




## 11.2　スカウティング機能

UNICORNには
・BufferPrep機能を用いたpHスカウティング
・最適なカラムを選択するカラムスカウティング
・至適分離条件を探すメソッドスカウティング
・サンプル添加量のスカウティング
など、さまざまな条件検討を自動的に行う機能があります。

設定のしかたは簡単で、まず基本となる溶出プログラムを作成します。次に変化させたい項目だけを抽出したテーブルを作成してパラメータを入力していきます。

> 注：スカウティングプログラムの各Runでフラクションを回収する場合、必ずフラクションの開始試験管もスカウティング設定してください。設定し忘れた場合、全てのRunで同じ試験管に回収される（重ね取り）になってしまいます。（設定方法は、各メソッド作成例の13,14項を参照してください。）

### 11.2.1　pHスカウティングのプログラミング例

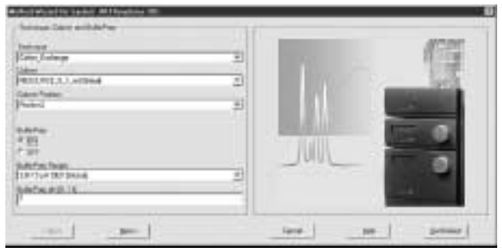
イオン交換クロマトグラフィーのプログラムをもとにして、pHスカウティングのプログラミングのしかたを示します。

下記の条件でのプログラム作成例

| | |
|---|---|
| カラム | RESOURCE S 1 ml |
| Buffer | CIEX　3.0-7.5 |
| 流速 | 4 ml/min |
| pH | 7, 6, 5, 4での至適条件検討 |
| カラム平衡化 | 5 CV |
| サンプル添加方法 | P-950によるサンプル自動充填 |
| 添加サンプル量 | 1ランにつき0.1ml |
| 溶出 | 0-50 %B　15 CV<br>50-100%B　0 CV<br>100%B　3 CV |
| 検出 | 280 nm, 254 nm, 214nm |
| カラムポジション | Position 2 |
| フラクション回収 | ＜Frac-950 18&30mm（イエロー）ラック使用＞ |
| 素通り画分 | すべてを1チューブ（50mlチューブ）に回収※ |
| 吸着画分 | 1mlずつ分取※ |
| | ※Frac-900を使用する場合は、素通り・吸着画分を連続して回収。 |

1. **新規メソッドの作成**
タスクバーの**Method Editor**をクリックし、メソッド作成画面に入ります。
**File　↓　New**
**New Method**ウインドウで **Wizard**を選択し、**OK**ボタンをクリックします。

2. **クロマトグラフィー手法、カラム等の設定**



| | |
|---|---|
| **Technique** | Cation Exchange |
| **Column** | RESOURCE S 1 ml |
| **Column Position** | Position 2 |
| **BufferPrep** | ON |
| **BufferPrep Recipe** | 3.0-7.5 pH CIEX |
| **BufferPrep pH** | 7 |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

3. **スタート条件の設定**

| | |
|---|---|
| **Wavelength UV1**（第1波長） | 280 nm<br>第2、第3波長はVariables画面で設定（後述、10項参照） |
| **Buffer Valve A Inlet** | A11 |
| **Start Concentration B** | 0%B |
| **Equilibration Volume** | 5CV（CV=カラム体積。一般的なAバッファーでのカラム平衡化の目安は3～5CVです。） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。



4. **サンプル添加方法の設定**

| | |
|---|---|
| **Injection technique** | **Sample Pump Loop Filling**<br>（**P-950**を使った、ループへの自動サンプル充填） |
| **Fill Loop with** | **0.2 ml**（サンプルループ + 85 $\mu$l以上。余裕を見て入力） |
| **Empty Loop With** | **0.2 ml**（ループ内の共液洗浄のため、実際のループ体積の**2-3**倍体積分入力します） |
| **Sample Inlet** | **S1** |
| **S-8 Rinse Sample Loop（0.5 ml）** | サンプルループ内の洗浄ステップです。1種類のサンプルを添加する場合は必要ありません。 |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

5. **Fracのセッティングと素通り画分回収の設定**
**＜Frac-950の場合＞**

| | |
|---|---|
| **Frac-950 Rack** | 18&30mm　Tubes |
| **Flowthrough Fractionation** | Frac-950 |
| **Fraction Volume** | 5 ml |
| **Tube Type** | 30 mm |
| **Start at** | First tube |

**＜Frac-900の場合＞**

| | |
|---|---|
| **Flowthrough Fractionation** | Frac-900 |
| **Fraction Volume** | 5 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

6. **Elution　Fractionation設定**
**＜Frac-950の場合＞**

| | |
|---|---|
| **Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定） | Frac-950 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |
| **Tube Type** | 18 mm |
| **Start at** | First Tube（分取開始試験管を指定） |

**＜Frac-900の場合＞**

| | |
|---|---|
| **Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定） | Frac-900 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

7. **Peak Fractionation設定**

| | |
|---|---|
| **Peak Fractionation** | OFF（ピーク分取しない） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

8. **Elution（溶出方法）の設定**

| | | |
|---|---|---|
| **Elution Technique** | Segmented Gradient | |
| **Number of Segments** | 3 | |
| **Wash Out Unbound Sample** | 2CV※ | 非吸着物質の洗浄 |
| **Clean After Gradient** | 5CV※ | グラジエント溶出終了後のConcB100%でのカラム洗浄（フラクション回収はしません） |
| **Reequilibration after Elution** | 5CV※ | ConcB 0%でのカラム再平衡化 |

pHスカウティング時は必要ありません。

※これらの数値の変更を行う場合、**Variables**画面にて行います。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

9-1. **Elution Segment1（3）（グラジエント）の設定1**

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 50 %B |
| **Length of Gradient** | 15 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

どのような形のグラジエントを描いたか、右図の**Update**ボタンを押すことで確認できます。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

9-2. **Elution Segment　2（3）（グラジエント）の設定2**

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100 %B |
| **Length of Gradient** | 0 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

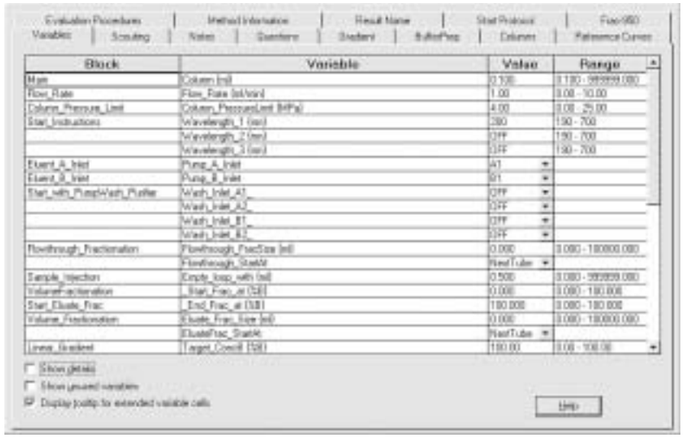
以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

9-3. **Elution Segment　3（3）（グラジエント）の設定3**

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100 %B |
| **Length of Gradient** | 3 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

以上を選択し、**Finish**ボタンをクリックします。

10. **Variables画面での入力項目**




・**Wizard**で設定してきた数値は、このような**Variables**画面で一覧になります。

**Wavelength UV2、UV3**（第2、第3波長）や、その他変更したい値があれば、**Valueセルをクリック**し、値を変更します。**ON,OFF**の変更は**マウス右クリック**、選択肢からの選択は**プルダウンメニュー**から選択、数値の変更は**ダブ**



＜**Variables**画面での主な変更・チェック項目＞

・**Wavelength**（第2、第3波長の設定）

・**Wash Out Unbound Sample**（非吸着画分の洗浄）の体積※

・**Clean after Elution at 100 %B**（溶出後のカラム洗浄）の体積※

・**Reequilibration**（カラムの再平衡化）の体積※

・**PeakFrac Parameters**（Slope方式でピークフラクションを設定した場合のSlope値）等

※これらの項目は、**Variables**画面下方の**Show details**ボックスにチェックを入れると表示されます。

**＜Frac-950の場合のみ＞**

・**Variables**画面と並んで表示される画面の中から、「**Frac-950**」を選択します。

| | |
|---|---|
| **Rack** | Wizardで設定したラックと一致しているか確認 |
| **Fraction Order** | Serpentine row（縦横計4種の中から選択） |

・**Variables**画面と並んで表示されるページの中から、「**BufferPrep**」を選択します。

| | |
|---|---|
| **BufferPrep** | **ON**になっていることを確認します。 |
| **BufferPrep Recipe** | 手順2で指定したレシピ（= 3.0 - 7.5pH CIEX）が選択されていることを確認します。 |

11. **スカウティング項目の選択**

**Scouting**のページをクリックします

**BufferPrep pH**を選択し、**OK**ボタンをクリックします。

12. **スカウティング条件の設定**

| **Run1** | **Run2** | **Run3** | **Run4** |
|---|---|---|---|
| **7.0** | **6.0** | **5.0** | **4.0** |

と入力します。

Scoutingの回数を増設するには、下の**Add**ボタン（または**Insert**ボタン）をクリックします。パラメータの変更をするには、**セルをダブルクリック**します。

＜13,14でのフラクションの設定は、Frac-950の場合＞

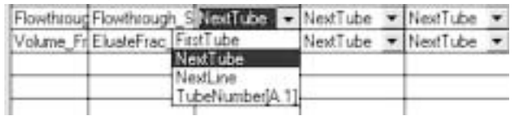
13. スカウティング項目の追加

このようなメソッドの場合、Flowthrough Fraction、Eluate Fractionの取り始めの試験管指定もスカウティングで設定する必要があります。

設定し忘れると、毎回のRunで、同一の試験管に回収するので注意！

**Scouting**ページの**Define**ボタンをクリックします。
**Show details**をチェックします。
**Flowthrough Start At**、**1_Start_at**（**EluateFrac StartAt**）をさらに選択し、**OK**ボタンを押クリックします。

14. スカウティング条件の設定2

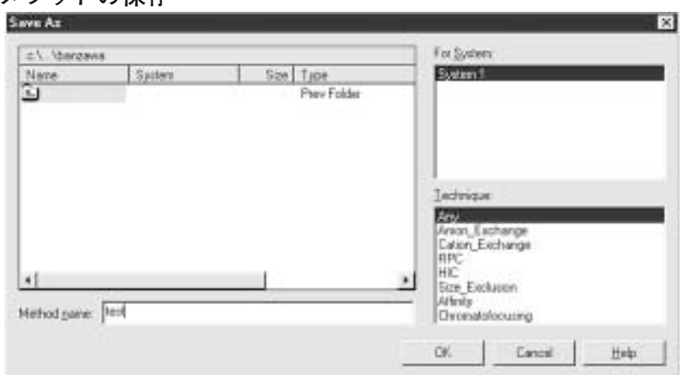



スクロールメニューをクリックすることで、選択肢から目的の項目を選択します。

| | Run1 | Run2 | Run3 | Run4 |
|---|---|---|---|---|
| BufferPrep pH | 7.0 | 6.0 | 5.0 | 4.0 |
| Flowthrough Start at | FirstTube | NextTube | NextTube | NextTube |
| 1_Start_at | FirstTube | NextTube | NextTube | NextTube |

以上のように設定します。
これで、Flowthrough FractionはX1,X2…、Eluate FractionはA1,A2…と進みます。

15. メソッドの保存






**File　↓　Save As**

| | |
|---|---|
| **Method name** | ファイル名を入力します |
| **Technique** | 手法を選択します |

メソッドは、この画面で選択したディレクトリに保存されます。

注：メソッドを実行すると、メソッド名の後に“001”から始まる番号が付いたものが、Resultファイル名になります。

以上を入力・選択し、**OK**をクリックします。

16. 作成したメソッドの確認

**UNICORN Main Menu**画面のMethodsウィンドウに、保存されたメソッド名が表示されます。

## 11.2.2　最適なカラムを選択するスカウティング例

疎水性相互作用クロマトグラフィーのプログラムをもとにして、カラムスカウティングのプログラミングの方法を示します。「11.2項 スカウティング機能」をはじめにお読みください。

下記の条件でのプログラム作成例

| | |
|---|---|
| 手法 | 疎水性相互作用クロマトグラフィー |
| カラム | RESOURCE HIC 1ml キット(PHE, ISO, ETHのスカウティング) |
| Buffer | **A: 0.1M Phosphate、2M 硫安（pH7.2）**<br>**B: 0.1M Phosphate（pH7.2）** |
| 流速 | 4 ml/min |
| カラム平衡化 | 5 CV |
| サンプル添加方法 | P-950を使ったループへの自動サンプル充填 |
| 添加サンプル量 | 1ランにつき0.1 ml |
| 溶出 | 0→100%　10 CV<br>100%　5 CV |
| 検出 | 280 nm, 254 nm, 214 nm |
| カラムポジション | Position 2, Position 3, Position 4 |
| フラクション回収 | ＜Frac-950 18&30mmラック（イエロー）使用＞ |
| 素通り画分 | すべてを1チューブ（50 mlチューブ）に回収※ |
| 吸着画分 | 1mlずつ分取※ |
| | ※Frac-900を使用する場合は、素通り・吸着画分とも、連続して回収します。 |

注：疎水性相互作用クロマトグラフィーのバッファーは、必ず
**Aポンプ：開始液（塩濃度の高いバッファー）**
**Bポンプ：溶出液（塩濃度の低いバッファー）**
のようにセットしてください。
**またElution方法は、必ずSegmented gradientをお使いください。**

**注：バッファー配置の例外（HICの場合のみ）**
**System Pump Direct Loading**（システムポンプからのサンプル直接添加）を行う場合、サンプルインレットは**B2**を使用します。**従って、この場合のみ、Aポンプ：溶出液、Bポンプ：開始液を配置します。**（4項の注意事項も併せてご確認ください。）グラジェント溶出は100 %B-0 %Bで行います。

1. 新規メソッドの作成
タスクバーの**Method Editor**をクリックし、メソッド作成画面に入ります。
**File　↓　New**
**New Method**ウィンドウで **Wizard**を選択し、**OK**ボタンを押します。

2. クロマトグラフィー手法、カラム等の設定

| | |
|---|---|
| **Technique** | HIC |
| **Column** | RESOURCE Eth 1 ml |
| **Column Position** | Position 2 |

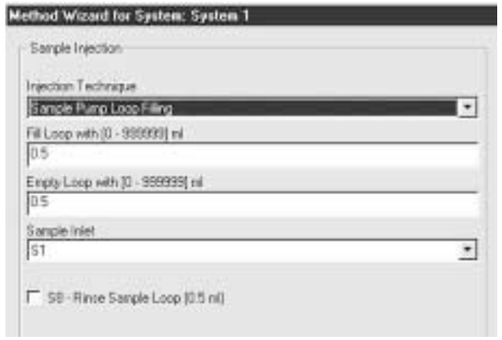
以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

3. スタート条件の設定

| | |
|---|---|
| **Wavelength UV1** | 280 nm<br>第2、第3波長はVariables画面で設定（後述、10項参照） |
| **Pump A Inlet** | A1 |
| **Pump B Inlet** | B1 |
| **Buffer Valve A Inlet** | A11 |
| **Start Concentration B** | 0%B |
| **Equilibration Volume** | 5CV（CV=カラム体積） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。）

4. サンプル添加方法の設定




| | |
|---|---|
| **Injection Technique** | **Sample Pump Loop Filling**<br>（P-950を使った、ループへの自動サンプル充填） |
| **Fill Loop with** | 0.2 ml（サンプルループ + 85µl以上。余裕を見て入力） |
| **Empty Loop With** | 0.2 ml（ループ内の共液洗浄のため、実際のループ体積の2-3倍体積分入力します） |
| **Sample Inlet** | S1 |
| **S-8 Rinse Sample Loop（0.5 ml）** | サンプルループ内の洗浄ステップです。1種類のサンプルを添加する場合は必要ありません。 |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。



5. Fracのセッティングと素通り画分回収の設定

＜Frac-950の場合＞

| | |
|---|---|
| **Frac-950 Rac** | 18&30mm Tubes |
| **Flowthrough Fractionation** | Frac-950 |
| **Fraction Volume** | 5 ml |
| **Tube Type** | 30 mm |
| **Start at** | First tube |

＜Frac-900の場合＞

| | |
|---|---|
| **Flowthrough Fractionation** | Frac-900 |
| **Fraction Volume** | 5 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

6. Elution Fractionation設定

＜Frac-950の場合＞

| | |
|---|---|
| **Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定） | Frac-950 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |
| **Tube Type** | 18 mm |
| **Start at** | First Tube（分取開始試験管を指定）） |

＜Frac-900の場合＞

| | |
|---|---|
| **Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定） | Frac-900 |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

7. PeakFractionation設定

| | |
|---|---|
| **Peak Fractionation** | OFF（ピーク分取しない） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

8. Elution（溶出方法）の設定

| | |
|---|---|
| **Elution Technique** | Segmented Gradient |
| **Number of Segments** | 2 |
| **Wash Out Unbound Sample** | 2CV※ |
| **Clean after Elution**（5CV）※ | at 100%B |
| **Reequilibration after Elution**（5CV）（カラム再平衡化） | |

再平衡化が必要な場合、チェックを入れてください。

※容量を変更する場合は、**Variables**画面で変更します。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

9-1. Elution Segment　1（2）（グラジエント）の設定1

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100%B |
| **Length of Gradient** | 10 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

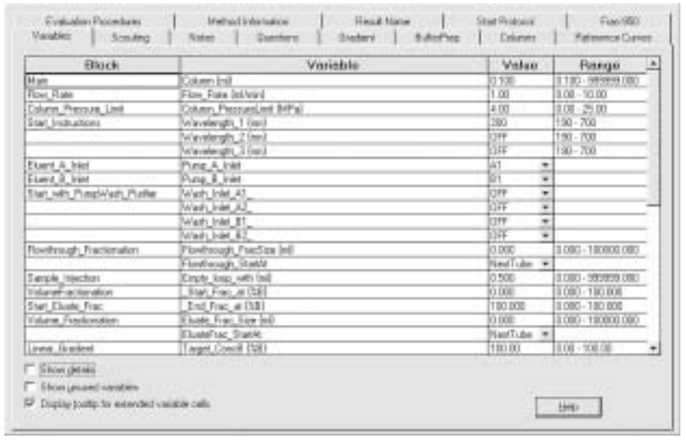
9-2. Elution Segment　2（2）（グラジエント）の設定2

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100%B |
| **Length of Gradient** | 5 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

どのような形のグラジエントを描いたか、右図で確認できます。**update**ボタンをクリックしてください。

以上を選択し、**Finish**ボタンをクリックします。

10. **Variables画面での入力項目**




・**Wizard**で設定してきた数値は、このような**Variables**画面で一覧になります。

**Wavelength UV2、UV3**（第2、第3波長）や、その他変更したい値があれば、**Valueセルをクリック**し、値を変更します。**ON, OFF**の変更は**マウス右クリック**、選択肢からの選択は**プルダウンメニュー**から選択、数値の変更は**ダブルクリック→数値入力→Enter**で行います。

＜**Variables**画面での主な変更・チェック項目＞
・**Wavelength**（第2、第3波長の設定）
・**Wash Out Unbound Sample**（非吸着画分の洗浄）の体積※
・**Clean after Elution**（溶出後のカラム洗浄）の体積※
・**Reequilibration**（カラムの再平衡化）の体積※
・**PeakFrac Parameters**（Slope方式でピークフラクションを設定した場合のSlope値）等
※これらの項目は、**Variables**画面下方の**Show details**ボックスにチェックを入れると表示されます。

＜**Frac-950**の場合のみ＞
・次に**Variables**画面と並んで表示される画面の中から、「**Frac-950**」を選択します。

| | |
|---|---|
| **Rack** | ここで選択されているラックが、Wizardで設定したラック（=18&30mm Tubes）と一致しているか確認します。 |
| **Fraction order** | Serpentine row（縦横計4種の中から選択） |

11. **スカウティング項目の選択**
**Variables**画面と並んで表示される画面の中から、「**Scouting**」のページをクリックします。
**Column**, **Column position**を選択し、**OK**ボタンをクリックします。

12. **スカウティング条件の設定**
Scoutingの回数を増設するには、下の**Add**ボタン（または**Insert**ボタン）を押します。

| | Run1 | Run2 | Run3 |
|---|---|---|---|
| Column | Resource ETH | Resource ISO | Resource PHE |
| Column position | Position2 | Position3 | Position4 |

と入力します。

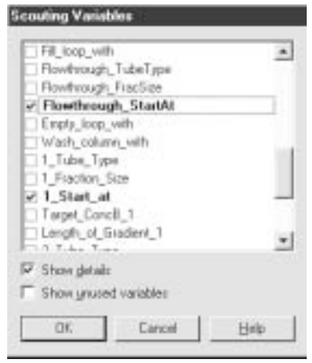
注：カラムを選択した時に、カラムサイズや推奨流速が変わる場合は、**Column Value update**のページが表示されます。**Yes**を選択してください。



＜13,14のFraction設定は、Frac-950の場合のみ＞

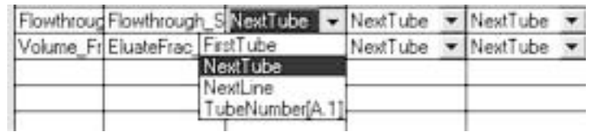
13. **スカウティング項目の追加**
このようなメソッドの場合、**Flouthrough Fraction**、**Eluate Fraction**の取り始めの試験管指定もスカウティングで設定する必要があります。

設定し忘れると、毎回のRunで、同一の試験管に回収するので注意！




**Scouting**ページの**Define**ボタンをクリックします。
**Show details**をチェックします。
**Flowthrough Start At**、**1_Start_at**を選択し、**OK**ボタンをクリックします。

14. **スカウティング条件の設定2**




スクロールメニューをクリックすることで、選択肢から目的の項目を選択します。

| | Run1 | Run2 | Run3 |
|---|---|---|---|
| Column | RESOURCE ETH | RESOURCE ISO | RESOURCE PHE |
| Column position | Position2 | Position3 | Position4 |
| Frowthrough Start At | FirstTube | NextTube | NextTube |
| 1_Start_At | FirstTube | NextTube | NextTube |

以上のように設定します。
これで、Flowthrough FractionはX1,X2…、Eluate FractionはA1,A2…と進みます。

15. **メソッドの保存**
**File ↓ Save As**

| | |
|---|---|
| **Method name** | ファイル名を入力します |
| **Technique** | 手法を選択します |

メソッドは、この画面で選択したディレクトリに保存されます。

注：メソッドを実行すると、メソッド名の後に“001”から始まる番号が付いたものが、Resultファイル名になります。

以上を入力・選択し、**OK**をクリックします。

16. **作成したメソッドの確認**

**UNICORN Main Menu**画面の**Methods**ウィンドウに、保存されたメソッド名が表示されます。

## 11.2.3　至適分離条件を探すメソッドスカウティング例

イオン交換クロマトグラフィーのプログラムをもとにして、メソッドスカウティングのプログラミングのしかたを示します。はじめに「11.2 スカウティング機能」の項をお読みください。

下記の条件でのプログラム作成例

| | |
|---|---|
| 手法 | イオン交換クロマトグラフィー |
| カラム | RESOURCE S 1 ml |
| Buffer | A: 50 mM MES（pH6.0） |
| | B: 50 mM MES 、1M NaCl（pH6.0） |
| 流速 | 4 ml/min |
| カラム平衡化 | 5CV |
| サンプル添加方法 | P-950を使ったループへの自動サンプル充填 |
| 添加サンプル量 | 1ランにつき0.1ml |
| 溶出 | 0-100% 10 CV, 15 CV, 20 CVのスカウティング |
| | 100% 0 CV |
| | 100% 3 CV |
| 検出 | 280 nm, 254 nm, 214 nm |
| カラムポジション | Position 2 |
| フラクション回収 | ＜Frac-950 18&30mmラック（イエロー）使用＞ |
| 素通り画分 | すべてを1チューブ（50 mlチューブ）に回収※ |
| 吸着画分 | 1mlずつ分取※ |
| | ※Frac-900の場合は、素通り・溶出画分とも連続して回収します。 |

1. **新規メソッドの作成**
   タスクバーの**Method Editor**をクリックし、メソッド作成画面に入ります。
   **File　↓　New**
   **New Method**ウインドウで **Wizard**を選択し、**OK**ボタンをクリックします。

2. **クロマトグラフィー手法、カラム等の設定**
   **Technique**　Cation Exchange
   **Column**　RESOURCE S 1 ml
   **Column Position**　Position2
   **BufferPrep**　OFF

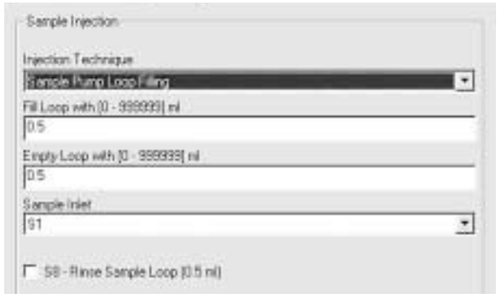
   以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

3. **スタート条件の設定**
   **Wavelength UV1**（第1波長）　280 nm
   第2、第3波長はVariables画面で設定（後述）
   **Pump Inlet**
   **Pump A Inlet**　A1
   **Pump B Inlet**　B1
   **Buffer Valve A Inlet**　A11
   **Start Concentration B**　0%B
   **Equilibration Volume**　5CV（CV=カラム体積。一般的なAバッファーでのカラム平衡化体積の目安は3～5CVです。）

   以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。



4. **サンプル添加方法の設定**




**Injection technique**　Sample Pump Loop Filling（P-950を使った、ループへの自動サンプル充填）
**Fill Loop with**　0.2 ml（サンプルループ + 85µl以上。余裕を見て入力）
**Empty Loop With**　0.2 ml（ループ内の共液洗浄のため、実際のループ体積の2-3倍体積分入力します）
**Sample Inlet**　S1
**S-8 Rinse Sample Loop**（0.5 ml）
サンプルループ内の洗浄ステップです。1種類のサンプルを添加する場合は必要ありません。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

5. **Fracのセッティングと素通り画分回収の設定**
   **＜Frac-950の場合＞**
   **Frac-950 Rack**　18&30mm　Tubes
   **Flowthrough Fractionation**　Frac-950
   **Fraction Volume**　5 ml
   **Tube Type**　30 mm
   **Start at**　First tube

   **＜Frac-900の場合＞**
   **Flowthrough Fractionation**　Frac-900
   **Fraction Volume**　5 ml

   以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

6. **Elution　Fractionation設定**
   **＜Frac-950の場合＞**
   **Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定）
   Frac-950
   **Fraction Volume**　1 ml
   **Tube Type**　18 mm
   **Start at**　First Tube（分取開始試験管を指定）

   **＜Frac-900の場合＞**
   **Fixed Volume Fractionation**（定量分画設定）
   Frac-900
   **Fraction Volume**　1 ml

   以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

7. **Peak Fractionation設定**
   **Peak Fractionation**　OFF（ピーク分取しない）

   以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

8. **Elution（溶出方法）の設定**

| | | |
|---|---|---|
| **Elution Technique** | Segmented Gradient | |
| **Number of Segments** | 3 | |
| **Wash Out Unbound Sample** | 2CV※ | 非吸着物質の洗浄 |
| **Clean After Gradient** | 5CV※ | グラジエント溶出終了後のConcB100%でのカラム洗浄（フラクション回収しません） |
| **Reequilibration after Elution** | 5CV※ | ConcB 0%でのカラム再平衡化 |

必要な場合、ボックスにチェックを入れてください。
※これらの数値の変更を行う場合、**Variables**画面にて行います。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

9-1. **Elution Segment　1（3）（グラジエント）の設定1**

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100 %B |
| **Length of Gradient** | 10 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

どのような形のグラジエントを描いたか、右図の**Update**ボタンを押すことで確認できます。
以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

9-2. **Elution Segment2（3）（グラジエント）の設定2**

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100 %B |
| **Length of Gradient** | 0 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

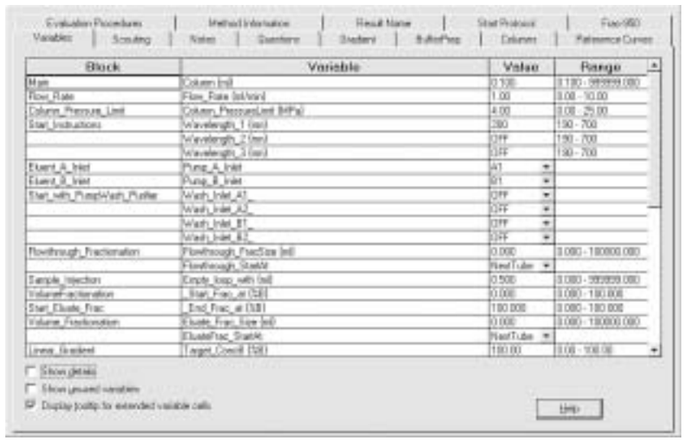
以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

9-3. **Elution Segment3（3）（グラジエント）の設定3**

| | |
|---|---|
| **Target Concentration B** | 100 %B |
| **Length of Gradient** | 3 CV |
| **Fraction Volume** | 1 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

10. **Variables画面での入力項目**

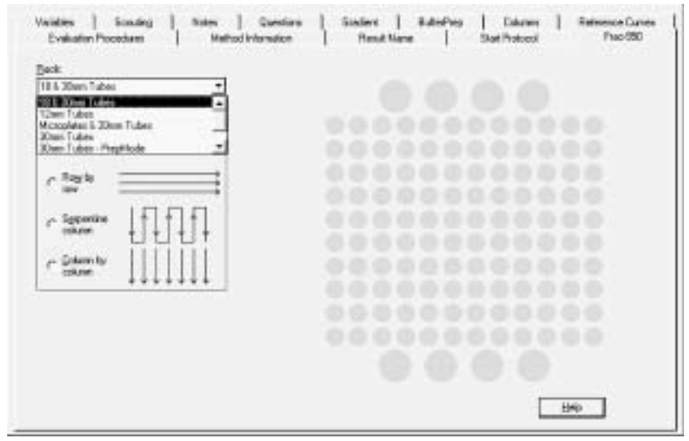



・**Wizard**で設定してきた数値は、このような**Variables**画面で一覧表示されます。

**Wavelength UV2、UV3**（第2、第3波長）や、その他変更したい値があれば、**Valueセルをクリック**し、値を変更します。**ON, OFF**の変更は**マウス右クリック**、選択肢からの選択は**プルダウンメニュー**から選択、数値の変更は**ダブルクリック→数値入力→Enter**で行います。



＜**Variables**画面での主な変更・チェック項目＞
・**Wavelength**（第2、第3波長の設定）
・**Wash Out Unbound Sample**（非吸着画分の洗浄）の体積※
・**Clean after Elution at 100 %B**（溶出後のカラム洗浄）の体積※
・**Reequilibration**（カラムの再平衡化）の体積※
・**PeakFrac Parameters**（Slope方式でピークフラクションを設定した場合のSlope値）等
※これらの項目は、**Variables**画面下方の**Show Details**ボックスにチェックを入れると表示されます。




＜**Frac-950の場合のみ**＞
・**Variables**画面と並んで表示される画面の中から、「**Frac-950**」を選択します。

| | |
|---|---|
| **Rack** | Wizardで設定したラックと一致しているか確認 |
| **Fraction order** | 分取の方向（縦横計4種の中から選択） |

11. **スカウティング項目の選択**
**Variables**画面と並んで表示される画面の中から、「**Scouting**」のページをクリックします。
**Show details**ボックスをチェックします。
**Target Conc B1**と**Length of Gradient1**を選択し、**OK**ボタンをクリックします。

12. **スカウティング条件の設定**
スカウティングの回数を増設するには下の**Add**ボタン（または**Insert**ボタン）をクリックします。パラメータを変更するには、**セルをダブルクリック**します。

| | Run1 | Run2 | Run3 |
|---|---|---|---|
| TargetConcB1 | 100 | 100 | 100 |
| Length of Gradient1 | 10 | 15 | 20 |

と入力します。

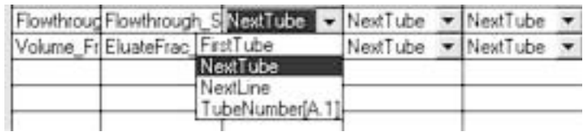
＜13,14でのFractionに関する設定は､Frac-950の場合のみ＞

13. スカウティング項目の追加

このようなメソッドの場合、**Flowthrough Fraction**、**Eluate Fraction**の取り始めの試験管指定もスカウティングで設定する必要があります（設定し忘れると、毎回のRunで、同一の試験管に回収するので注意！）。

**Scouting**ページの**Define**ボタンをクリックします。
**Show details**をチェックします。
**Flowthrough Start At、1_Start_at**（EluateFrac StartAt）を選択し、**OK**ボタンをクリックします。

14. スカウティング条件の設定2




スクロールメニューをクリックすることで、選択肢から目的の項目を選択します。

| | Run1 | Run2 | Run3 |
|---|---|---|---|
| TargetConcB1 | 100 | 100 | 100 |
| Length of Gradient1 | 10 | 15 | 20 |
| Flowthrough Start At | FirstTube | NextTube | NextTube |
| 1_Start_at | FirstTube | NextTube | NextTube |

以上のように設定します。
これで、Flowthrough FractionはX1,X2…、Eluate FractionはA1,A2…と進みます。

15. メソッドの保存

**File ↓ Save As**

| | |
|---|---|
| **Method Name** | ファイル名を入力します |
| **Technique** | 手法を選択します |

メソッドは、この画面で選択したディレクトリに保存されます。

注：メソッドを実行すると、メソッド名の後に“001”から始まる番号が付いたものが、Resultファイル名になります。

以上を入力・選択し、**OK**をクリックします。

16. 作成したメソッドの確認

**UNICORN Main Menu**画面の**Methods**ウィンドウに、保存されたメソッド名が表示されます。



## 11.2.4　サンプル添加量のメソッドスカウティング例

イオン交換クロマトグラフィーのプログラムをもとにして、サンプル添加量のメソッドスカウティングのプログラミングのしかたを示します。はじめに「11.2 スカウティング機能」の項をお読みください。

下記の条件でのプログラム作成例

| | |
|---|---|
| 手法 | イオン交換クロマトグラフィー |
| カラム | RESOURCE S 1 ml |
| Buffer | A: 50 mM MES（pH6.0） |
| | B: 50 mM MES 、1M NaCl（pH6.0） |
| 流速 | 4 ml/min |
| カラム平衡化 | 5 CV |
| サンプル添加方法 | P-950を使ったスーパーループへの自動サンプル充填 |
| 添加サンプル量 | 2.5, 5.0, 10, 20 ml （50mlスーパーループ使用） |
| 溶出 | 0-50% 15 CV |
| | 100% 0 CV |
| | 100% 3 CV |
| 検出 | 280 nm, 254 nm, 214 nm |
| カラムポジション | Position 2 |
| フラクション回収 | ＜Frac-950 18&30mmラック（イエロー）使用＞ |
| 素通り画分 | すべてを1チューブ（50 mlチューブ）に回収※ |
| 吸着画分 | 1mlずつ分取※ |
| | ※Frac-900の場合、素通り・溶出画分とも連続して回収します。 |

1. 新規メソッドの作成

タスクバーの**Method Editor**をクリックし、メソッド作成画面に入ります。
**File ↓ New**
**New Method**ウインドウで **Wizard**を選択し、**OK**ボタンを押します。

2. クロマトグラフィー手法、カラム等の設定

| | |
|---|---|
| **Technique** | Cation Exchange |
| **Column** | RESOURCE S 1 ml |
| **Column Position** | Position 2 |
| **BufferPrep** | OFF |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

3. スタート条件の設定

| | |
|---|---|
| **Wavelength UV1**（第1波長） | 280 nm（第2、第3波長はVariables画面で設定） |
| **Pump A Inlet** | A1 |
| **Pump B Inlet** | B1 |
| **Buffer Valve A Inlet** | A11 |
| **Start Concentration B** | 0%B |
| **Equilibration Volume** | 5CV（CV=カラム体積。一般的なバッファーAでのカラム平衡化体積の目安は3～5CVです。） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

4. サンプル添加方法の設定

| | |
|---|---|
| Injection technique | Sample Pump Loop Filling<br>（P-950を使った、ループへの自動サンプル充填） |
| Fill Loop with | 40 ml |
| Empty Loop With | 2.5 ml |
| Sample Inlet | S1<br>（実際には使用しません。P-950・Frac-950簡易マニュアルp12､Bスーパーループへのサンプル充填 配管図参照） |
| S8-Rinse Sample Loop(0.5) | チェックははずします |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

5. Frac-950のセッティングと素通り画分回収の設定

＜Frac-950の場合＞

| | |
|---|---|
| Frac-950 Rack | 18&30mm　Tubes |
| Flowthrough Fractionation | Frac-950 |
| Fraction Volume | 50 ml（最大値）<br>（このメソッドでは、各スカウティングランでのサンプル量を変化させますので、素通り画分の量が毎回異なるため、FlrouthroughのFraction Volumeは最大値を入力します） |
| Tube Type | 30 mm |
| Start at | First tube |

＜Frac-900の場合＞

| | |
|---|---|
| Flowthrough Fractionation | Frac-900 |
| Fraction Volume | 5 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

6. Elution Fractionation設定

＜Frac-950の場合＞

| | |
|---|---|
| Fixed Volume Fractionation | （定量分画設定）<br>Frac-950 |
| Fraction Volume | 1 ml |
| Tube Type | 18 mm |
| Start at | First tube（分取開始試験管を指定） |

＜Frac-900の場合＞

| | |
|---|---|
| Fixed Volume Fractionation | （定量分画設定）<br>Frac-900 |
| Fraction Volume | 1 ml |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

7. Peak Fractionation設定

| | |
|---|---|
| Peak Fractionation | OFF（ピーク分取しない） |

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

8. Elution（溶出方法）の設定

| | | |
|---|---|---|
| Elution Technique | Segmented Gradient | |
| Number of Segments | 3 | |
| Wash Out Unbound Sample | 2CV※ | 非吸着物質の洗浄 |
| Clean After Gradient | 5CV※ | グラジエント溶出終了後のConcB100%でのカラム洗浄（フラクション回収しません） |
| Reequilibration after Elution | 5CV※ | ConcB 0%でのカラム再平衡化 |



必要な場合、ボックスにチェックを入れてください。
※これらの数値の変更を行う場合、**Variables**画面にて行います。

以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

9-1. Elution Segment　1（3）（グラジエント）の設定1

| | |
|---|---|
| Target Concentration B | 50 %B |
| Length of Gradient | 15 CV |
| Fraction Volume | 1 ml |

と入力します。
どのような形のグラジエントを描いたか、右図の**Update**ボタンを押すことで確認できます。
以上を選択し、**Finish**ボタンをクリックします。

9-2. Elution Segment　2（3）（グラジエント）の設定2

| | |
|---|---|
| Target Concentration B | 100 %B |
| Length of Gradient | 0 CV |
| Fraction Volume | 1 ml |

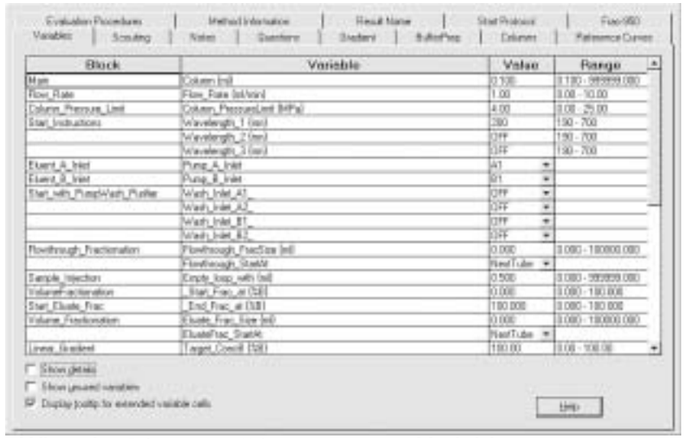
以上を選択し、**Next>**ボタンをクリックします。

9-3. Elution Segment　3（3）（グラジエント）の設定3

| | |
|---|---|
| Target Concentration B | 100 %B |
| Length of Gradient | 3 CV |
| Fraction Volume | 1 ml |

以上を選択し、**Finish**ボタンをクリックします。

10. Variables画面での入力項目




・**Wizard**で設定してきた数値は、このような**Variables**画面で一覧になります。

**Wavelength UV2、UV3**（第2、第3波長）や、その他変更したい値があれば、**Valueセルをクリック**し、値を変更します。**ON, OFF**の変更は**マウス右クリック**、選択肢からの選択は**プルダウンメニュー**から選択、数値の変更は**ダブルクリック→数値入力→Enter**で行います。

＜**Variables**画面での主な変更・チェック項目＞
・**Wavelength**（第2、第3波長の設定）
・**Wash Out Unbound Sample**（非吸着画分の洗浄）の体積※
・**Clean after Elution at 100 %B**（溶出後のカラム洗浄）の体積※
・**Reequilibration**（カラムの再平衡化）の体積※
・**PeakFrac Parameters**（**Slope**方式でピークフラクションを設定した場合の**Slope**値）等
※これらの項目は、**Variables**画面下方の**Show details**ボックスにチェックを入れると表示されます。

＜Frac-950の場合のみ＞
・次にVariables画面と並んで表示される画面の中から、「Frac-950」を選択します。

| | |
|---|---|
| Rack | Wizardで設定したラック（=18&30mm Tubes）と一致しているか確認 |
| Fraction order | （縦横計4種の中から選択） |

11. スカウティング項目の選択
Variables画面と並んで表示される画面の中から、「Scouting」のページをクリックします。
Fill loop withとEmpty Loop withを選択し、OKボタンをクリックします。

12. スカウティング条件の設定
Scoutingの回数を増設するには、下のAddボタン（またはInsertボタン）をクリックします。パラメータを変更するには、セルをダブルクリックします。

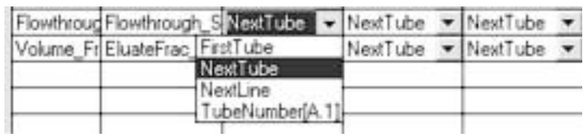
| | Run1 | Run2 | Run3 | Run4 |
|---|---|---|---|---|
| Fill loop with | 40 | 0 | 0 | 0 |
| Empty Loop with | 2.5 | 5 | 10 | 20 |

と入力します。

＜13.14でのFractionに関する設定は、Frac-950の場合のみ＞
13. スカウティング項目の追加
このようなメソッドの場合、Flowthrough Fraction、Eluate Fractionの取り始めの試験管指定もスカウティングで設定する必要があります（設定し忘れると、毎回のRunで、同一の試験管に回収するので注意！）。

Scoutingページの Defineボタンをクリックします。
Show detailsをチェックします。
Flowthrough Start At、1_Start_at（EluateFrac StartAt）を選択し、OKボタンをクリックします。

14. スカウティング条件の設定2




スクロールメニューをクリックすることで、選択肢から目的の項目を選択します。

| | Run1 | Run2 | Run3 | Run4 |
|---|---|---|---|---|
| Fill loop with | 40 | 0 | 0 | 0 |
| Empty Loop with | 2.5 | 5 | 10 | 20 |
| Flowthrough Start At | FirstTube | NextTube | NextTube | NextTube |
| 1_Start_at | FirstTube | NextTube | NextTube | NextTube |

以上のように設定します。
これで、Flowthrough FractionはX1,X2…、Elute FractionはA1,A2…と進みます。



15. メソッドの保存
File ↓ Save As

| | |
|---|---|
| Method Name | ファイル名を入力します |
| Technique | 手法を選択します |

メソッドは、この画面で選択したディレクトリに保存されます。

注：メソッドを実行すると、メソッド名の後に“001”から始まる番号が付いたものが、Resultファイル名になります。

以上を入力・選択し、OKをクリックします。

16. 作成したメソッドの確認

UNICORN Main Menu画面のMethodsウィンドウに、保存されたメソッド名が表示されます。

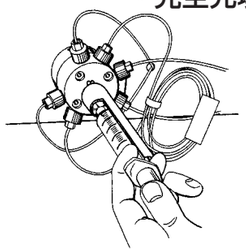
# 12. メソッドの実行

タスクバーの**System Control**をクリックします。

## 12.1　サンプル準備

### 12.1.1.　マニュアルサンプル充填

#### ・完全充填



サンプルループと同じボリュームをサンプルループに充填します。サンプルループより少ないと、サンプルループ内のエアーがカラムに入ってしまいます。

1. インジェクションバルブのポジションが**LOAD**であることを確認します。
2. シリンジでサンプルループと同じボリュームをサンプルループに充填します。

   注：分析など精度、再現性が要求される場合はサンプルループのボリュームの5倍量を充填してください。

3. シリンジは差したままにしておきます。

   注：Loadポジションのままシリンジを抜くとサンプルが廃液チューブ（**S1**チューブ）に流れてしまう恐れがあります。

#### ・一部充填

サンプルがサンプルループのボリュームより少ない場合や、サンプルロスを最小に抑えたい時は一部充填を使用します。

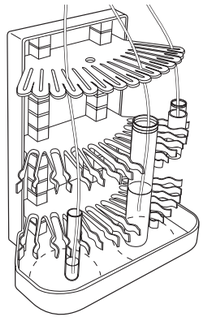
1. インジェクションバルブのポジションが**LOAD**であることを確認します。
2. シリンジにサンプルループの5倍以上のバッファーを入れます。
3. シリンジでサンプルループにバッファーを充填します。シリンジは差したままにします。

   注：インジェクションバルブのポジション**Load**のままシリンジを抜くと、バッファーが抜けエアーがサンプルループに入る恐れがあります。

4. **Manual　↓　Flowpath　→　Injection Valve　→　Inject Execute**をクリックします。
5. シリンジをインジェクションフィルポートから抜きます。
6. シリンジにサンプルを入れます。
7. シリンジをインジェクションバルブのインジェクションフィルポートに差します。
8. **Manual　↓　Flowpath　→　Injection Valve　→　Load Execute**をクリックします。
9. シリンジのサンプルを静かにサンプルループに充填します。
10. シリンジをインジェクションフィルポートに差したままにします。



### 12.1.2　サンプルポンプ自動添加



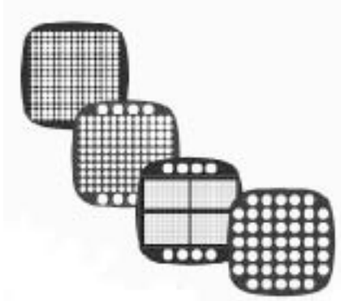
サンプルポンプP-950を使用した自動サンプル充填・添加を行う場合は、必ず事前にP-950のエア抜きを行い、添加するサンプルすべてにサンプルインレットチュービング（S1,S2…）をつけてください。
エア抜き方法は、P-950配管ごとに異なりますので、
・サンプルループへの自動サンプル充填　→　7.3章（25ページ）
・スーパーループへの自動サンプル充填　→　7.4章（27ページ）
・カラムへの直接サンプル添加　→　7.5章（29ページ）
をご参照のうえ準備をして下さい。

## 12.2　フラクションコレクターの確認

Frac-950とFrac-900では方法が異なります。
Frac-900の場合は次頁＜Frac-900の場合＞（P.87）をご参照ください。

**＜Frac-950の場合＞**

1. メソッドで指定したラックが正しくセットされているか確認します。



2. 使用する流速に応じて、チューブ送りモードを変更・確認します。（～2ml/min；TubeまたはDropSyncro、2ml/min～；Accumulator）
   変更は、**SystemControl**画面より
   **Systems　↓　Settings　→　Specials　→　Frac Parameters　→　TubeChange**より選択
3. **Outlet Valve F2**の配管が、2で設定したモードと一致しているか確認します（P.37参照）。（Accumulatorを選んでいる場合、チュービングがAccumulatorを経由しているかどうか確認します）
4. ディレイボリュームが適切に入力されていることを確認します。
   **System Control**モードより
   **Systems　↓　Settings　→　Specials　→　Frac Parameters　→　DelayVol**で入力します。
   ディレイボリュームは下記の表をご参照ください。

**ÄKTAexplorer 10Sの場合**

Accumulator使用時

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径0.25mm（青） | 256 µl | — |
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 451 µl | 573 µl |

Accumulator 不使用時

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径0.25mm（青） | 105 µl | — |
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 301 µl | 423 µl |

### ÄKTAexplorer 100の場合

Accumulator使用時

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 448 µl | 570 µl |
| 内径 0.75mm（グリーン） | 775 µl | 924 µl |
| 内径 1.0mm（ベージュ） | 1232 µl | 1418 µl |

Accumulator 不使用時

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 297 µl | 419 µl |
| 内径 0.75mm（グリーン） | 624 µl | 773 µl |
| 内径 1.0mm（ベージュ） | 1081 µl | 1267 µl |

### ＜Frac-900の場合＞

1. フラクションコレクターに試験管がセットされているか、チューブセンサーの位置を確認します。

2. フラクションアームのチューブがコネクターから5mm出ているかも確認してください。

3. 素通りフラクションを一括で集める場合は**Outlet Valve F3**チューブ（オレンジPEEKチューブ）を別容器（例：三角フラスコなど）に接続してください。

4. ディレイボリュームが適切に入力されていることを確認します。
   System Controlモードより
   **Systems ↓ Settings → Specials → FracParameters → DelayVol**で入力します。
   ディレイボリュームは下記の表をご参照ください。

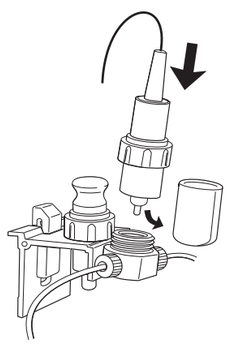
### ÄKTAexplorer 10Sの場合

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径0.25mm（ブルー） | 105 µl | — |
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 301 µl | 423 µl |

### ÄKTAexplorer 100の場合

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 297 µl | 419 µl |
| 内径 0.75mm（グリーン） | 624 µl | 773 µl |
| 内径 1.0mm（ベージュ） | 1087 µl | 1267 µl |

## 12.3 pH電極準備

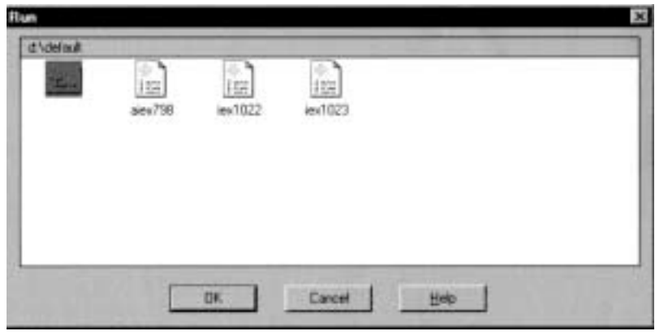


pH電極を使用する場合は、キャリブレーション（18.2 pH電極キャリブレーション参照 P.129）した後、pHフローセルに電極をセットします。
注：エアが入らないように入れてください。



## 12.4 メソッド実行

1. 実行するメソッドの選択します。
   **System Control**モードより
   **File ↓ Run**



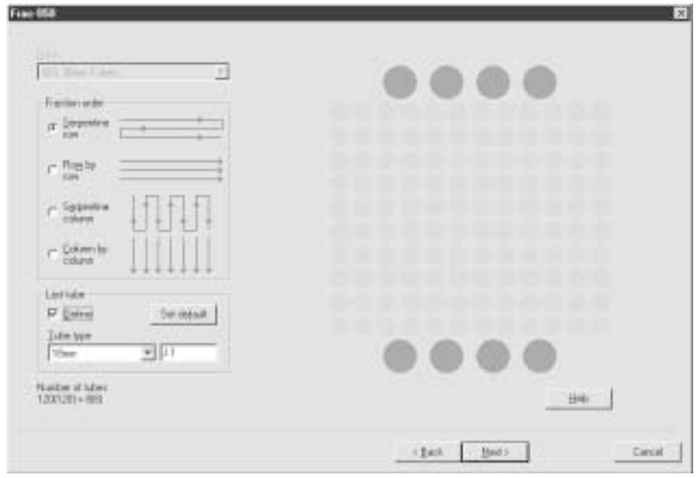

2. 実行するメソッドをクリックします。

3. **OK**をクリックします。

4. **Start protocol**で選択したものが、表示されます。メソッドを確認し、**Next**ボタンをクリックします。

### ＜Frac-950の場合＞

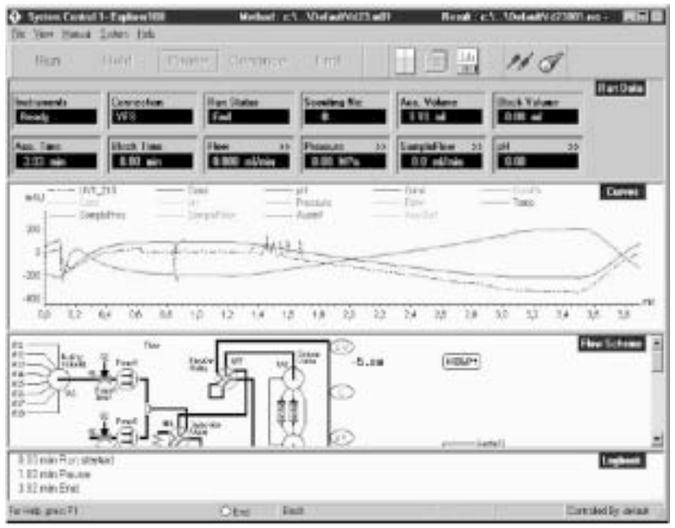
・**Frac-950**画面が表示されますので、**Rack、Fraction order**を確認します。また**Last tube**で**Define**をチェックし、最後の試験管位置を指定します。（Rackの図の上をクリックすることで指定できます。）




5. **Start**をクリックし、メソッドを実行します。

注：メソッドを変更した場合は保存後、再読み出しをしてから実行してください。
保存しただけでは、変更内容は実行メソッドには反映されません。

# 13. 実行中の画面表示



## 13.1　ウィンドウの選択

1. ウィンドウ選択ボタンをクリックします。
   またはView　↓　Panes...

2. Run data、Curvesをチェックし、OKをクリックします。

3. ウィンドウのサイズは、ウィンドウの境界にカーソルを移動させ、**マウスの左ボタン**を押しながら（クリック＆ドラッグ）、希望するサイズまで移動します。

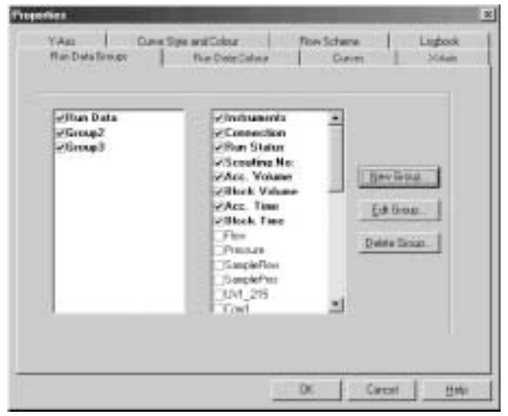
## 13.2　ウィンドウ表示

### 13.2.1　Run data

1. Run dataウィンドウにカーソルを移動させ、**マウスの右ボタン**をクリックします。



2. Propertiesを選択し、Run Data Groupsのページを表示します。

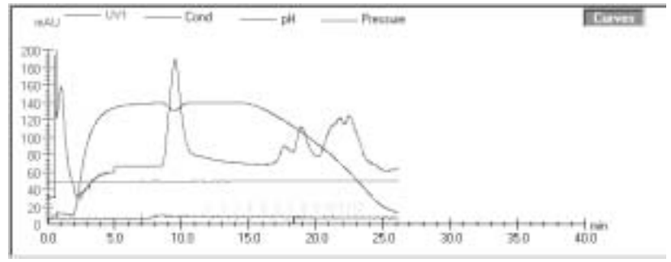



3. 表示したい項目をクリックし、チェックします。解除するには、もう一度クリックします。

4. 指定したレイアウトを保存する場合は、New Groupをクリックし、レイアウトを指定し、グループ名を入力します。

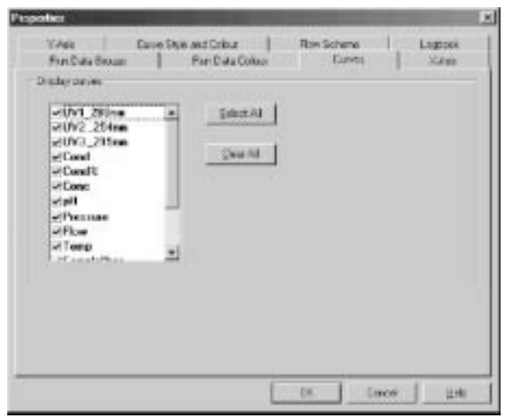
5. OKをクリックします。

### 13.2.2　Curves




1. Curvesウィンドウにカーソルを移動させ、**マウスの右ボタン**をクリックします。

2. Propertiesを選択し、Curvesのページを表示します。




3. 表示したい項目をクリックし、チェックします。もう一度クリックすると解除されます。全てのカーブを表示したい場合は、Select Allボタンをクリックします。

4. OKをクリックします。

・カーソルの表示

1. **Curves**ウィンドウにカーソルを移動させ、**マウスの右ボタン**をクリックし、**Marker**を選択します。

2. カーソルをマウスでドラッグし、値を読みたい位置まで移動します。

3. カーソルのある位置のX軸、Y軸の値がウィンドウ右上部に表示されます。

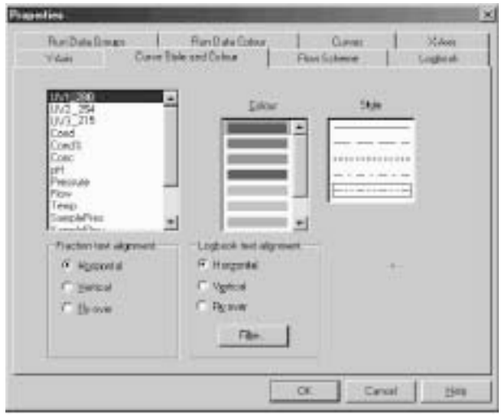
4. 表示する値の変更は、X軸、Y軸をクリックし、見たい軸を表示します。

5. カーソルを消す場合は、**マウスの右ボタン**をクリックし、**Marker**をクリックします。

・カーブの色と線種の変更

1. **Curves**ウィンドウにカーソルを移動させ、**マウスの右ボタン**をクリックし、**Properties**を選択します。

2. **Curve Style and Color**ページを選択します。



3. リストからカーブの色と線の種類を選択します。

4. **OK**をクリックします。

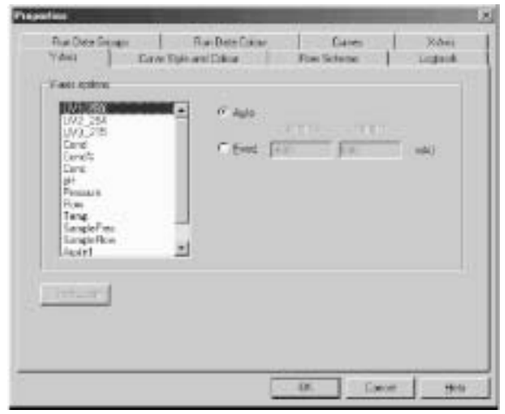


・Y軸のスケールの変更

Y軸はオートフルスケール表示されます。固定軸に変更することもできます。

1. **Curves**ウィンドウにカーソルを移動させ、**マウスの右ボタン**をクリックし、**Properties**を選択します。

2. **Y-Axis**のページをクリックします。



3. 固定軸表示したいカーブを選択し、**Fixed**ボタンをクリックし、表示したい範囲を入力します。

4. 他のカーブについても同様に行います。

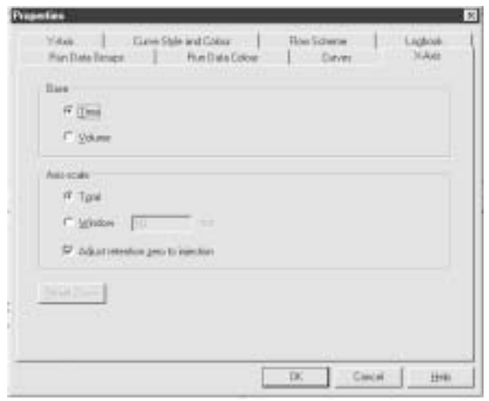
5. **OK**をクリックします。

・X軸のスケールの変更

X軸をクリックすると、**Time（min）**、**Volume（ml）**の表示の切り替えができます。

1. **Curves**ウィンドウにカーソルを移動させ、**マウスの右ボタン**をクリックし、**Properties**を選択します。

2. **X-Axis**のページをクリックします。



3. **Time（min）**か**Volume（ml）**の選択をします。

4. 軸のスケールを選択し、**Total**か**Window**の選択をします。Totalは実行中のカーブが全て画面に表示されます。Windowは指定した範囲だけ表示されます。

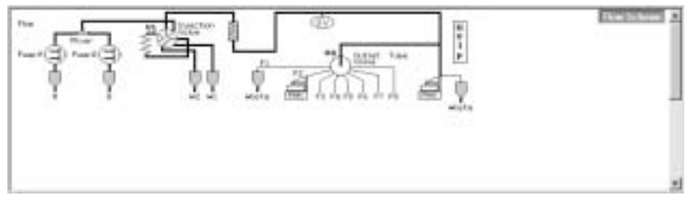
5. **OK**をクリックします。

・ズーム

1. **マウスの左ボタン**をクリックしたまま、マウスを移動させると点線の枠が表示されます。拡大したい範囲をその枠で囲ってください。
2. マウスのボタンを放すと、枠で囲った範囲が拡大されます。
3. 繰り返すとさらに拡大することができます。
4. ひとつ前の画面に戻す場合は、**マウスの右ボタン**をクリックし、**Undo Zoom**を選択します。
5. ズームを解除して元のサイズに戻す場合は、**マウスの右ボタン**をクリックし、**Reset Zoom**をクリックします。

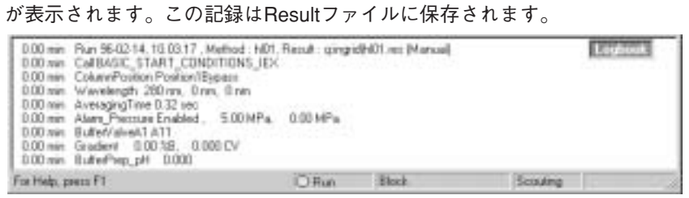
### 13.2.3 フロースキーム（流路図）

1. ウィンドウ選択ボタンをクリックします。
   または**View** ↓ **Panes...**
2. **Flow Scheme**をチェックします。
3. ウィンドウのサイズは、ウィンドウの境界にカーソルを移動させ、**マウスの左ボタン**を押しながら（クリック＆ドラッグ）、希望するサイズまで移動します。
4. システムの流路図が表示されます。現在送液されている流路はカラー（緑色）で表示されます。また、各モニターの値も表示されます。



### 13.2.4 Logbook

1. ウィンドウ選択ボタンをクリックします。
   または**View** ↓ **Panes...**
2. **Logbook**をチェックします。
3. ウィンドウのサイズは、ウィンドウの境界にカーソルを移動させ、**マウスの左ボタン**を押しながら（クリック＆ドラッグ）、希望するサイズまで移動します。
4. メソッド実行中の出来事（実行されたコマンド、警告やエラーメッセージなど）記録が表示されます。この記録はResultファイルに保存されます。






## 13.3 マニュアル操作

### 13.3.1 ツールバー

**System Control**の画面上部にあります。

**Run** ：メソッドが実行されている時はグレー表示になります。

**Hold** ：ポンプからの送液は止めずに、今の状況を維持したい場合にクリックします。
メソッドの内容は**Continue**ボタンがクリックされるまで一時停止します。

**Pause** ：ポンプからの送液を止め、今の状況を一時停止したい場合にクリックします。
メソッドの内容は**Continue**ボタンがクリックされるまで一時停止します。
システムにエラーが起きた場合自動的に**Pause**になります。

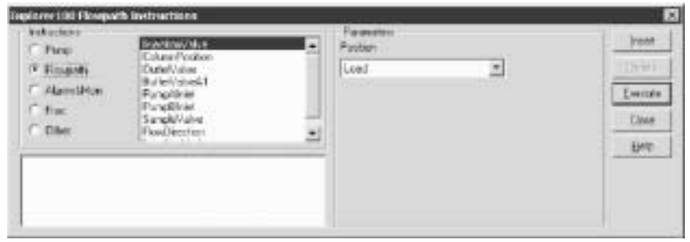
**Continue** ：**Hold, Pause**の解除をします。

**End** ：実行しているメソッドを中断し終了します。

### 13.3.2 マニュアル命令

メソッド実行中にマニュアル操作で命令を追加したり、変更することができます。

1. メニューバーの**Manual**よりコマンドを選択し、**Execute**をクリックします。

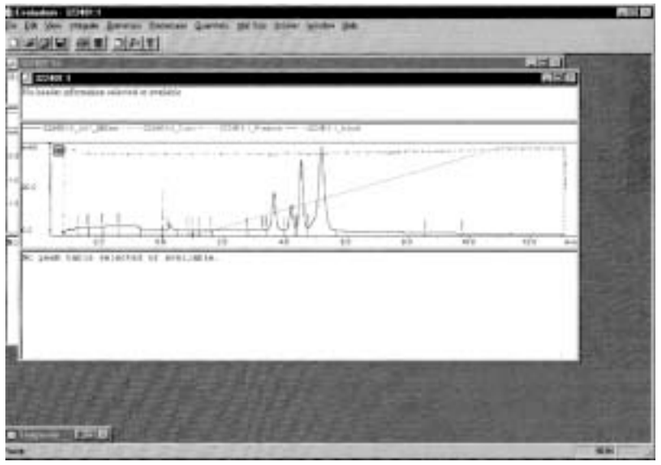


### 13.3.3 強制終了

メソッド実行中にマニュアル操作で、強制終了することができます。強制終了までのデータを保存することもできます。

1. ツールバーの**END**をクリックします。
2. **End Method**のダイアログボックスが表示されます。
3. 強制終了までのデータを保存する場合は**Save partial result**がチェックされた状態で**OK**ボタンをクリックします。

# 14. データ処理（Evaluation）



## 14.1　データの呼び出し

1. タスクバーの**Evaluation**をクリックします。

2. ファイルを指定します。
   **File　↓　Open...**

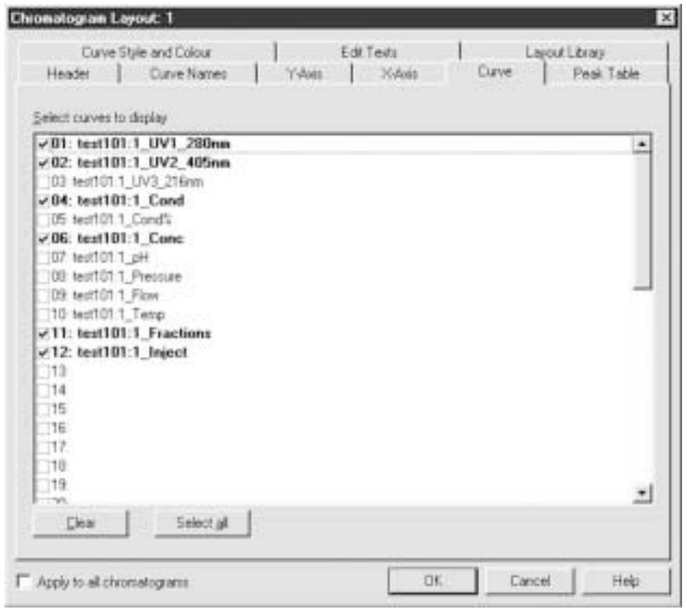
3. ファイルが表示されます。ファイルを選択し、**OK**をクリックします。

## 14.2　画面表示

1. 表示されたウィンドウにカーソルを移動し、**マウスの右ボタン**をクリックします。

2. メニューから**Properties**を選択します。

3. **Chromatogram Layout**ウィンドウが表示されます。






### 14.2.1　カーブの選択

1. **Chromatogram Layout**のウィンドウより、**Curves**ページをクリックします。

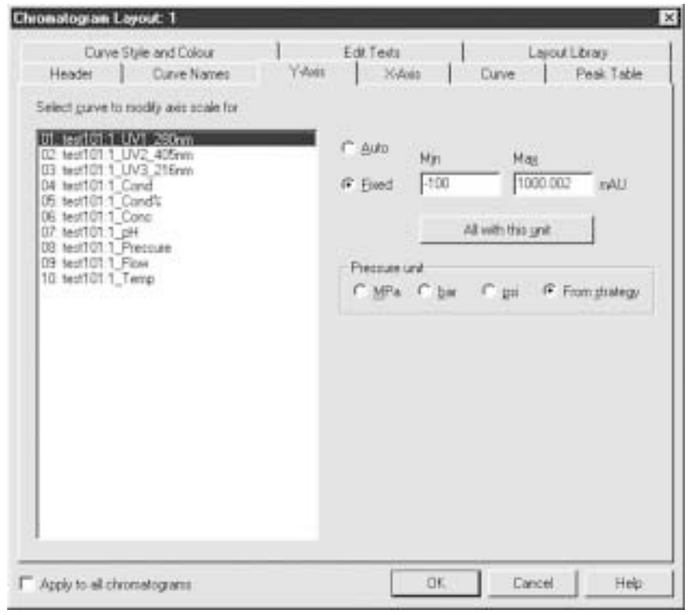
2. 画面表示したいカーブを指定します。チェックしているものが表示されます。指定を解除する場合は、もう一度クリックします。

3. **OK**をクリックします。

### 14.2.2　軸の設定

・**Y軸**

1. **Chromatogram Layout**のウィンドウより、**Y-Axis**ページをクリックします。




2. 軸の設定をしたいカーブをクリックし選択します。

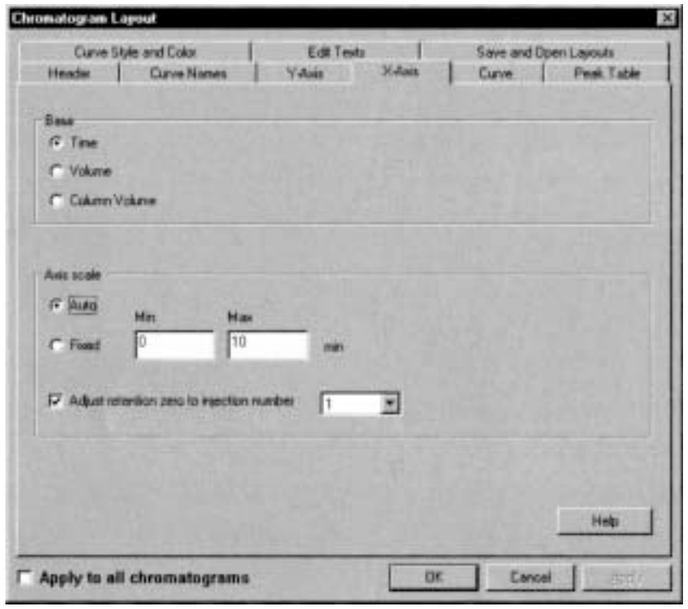
3. 選択したカーブのスケール表示を、**Auto**（オートフルスケール）または**Fixed**（固定軸表示）で表示できます。

4. 3つのUVカーブを同じスケールで表示したい場合は、**All with this unit**をクリックします。

5. **OK**をクリックします。

・X軸

1. **Chromatogram Layout**のウィンドウより、**X-Axis**ページをクリックします。



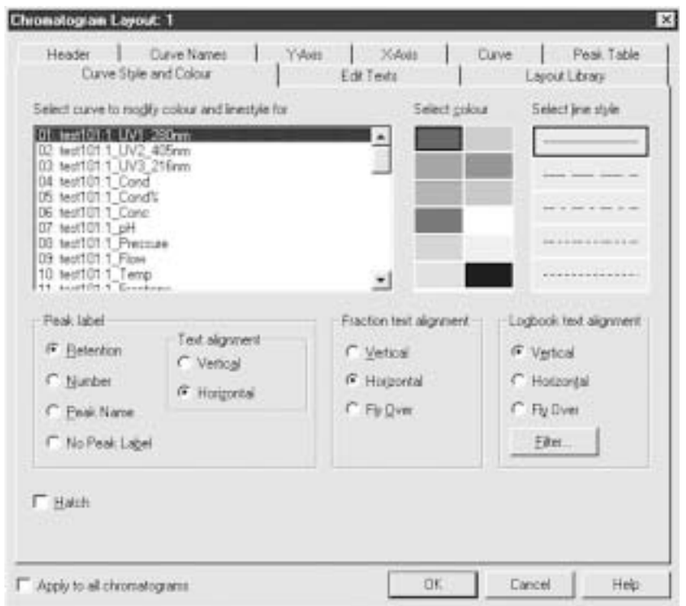

2. X軸のベース（時間、ボリューム、カラムボリューム）の指定とスケール表示を、**Auto**（オートフルスケール）または**Fixed**（固定軸表示）で表示できます。

3. **Adjust retention zero to injection number**をチェックしていると、サンプル添加のリテンションタイム（ボリューム）を0min（ml）として表示します。

4. **OK**をクリックします。

### 14.2.3　カーブの色、線種の変更

1. **Chromatogram Layout**のウィンドウより、**Curve Style and Colour**ページをクリックします。






2. 変更したいカーブをリストより選択しクリックします。

3. 希望の色と線の種類（実線、点線...）を選択します。

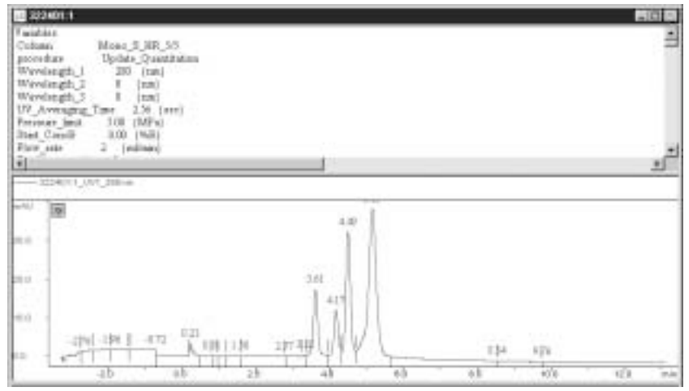
4. **OK**をクリックします。

### 14.2.4　インフォーメーションの表示

1. **Chromatogram Layout**のウィンドウより、**Header**ページをクリックします。

2. カーブウィンドウのヘッダーに表示したい項目（例：**Questions**）を選択します。

3. 選択した内容がヘッダーとして表示されます。



4. 表示したくない場合は、チェックを消します。

5. **OK**をクリックします。

### 14.2.5　レイアウトの保存

指定したレイアウトを保存することができます。

1. **Chromatogram Layout**のウィンドウより、**Layout Library**ページをクリックします。

2. **Save current Layout as...** ボタンをクリックします。

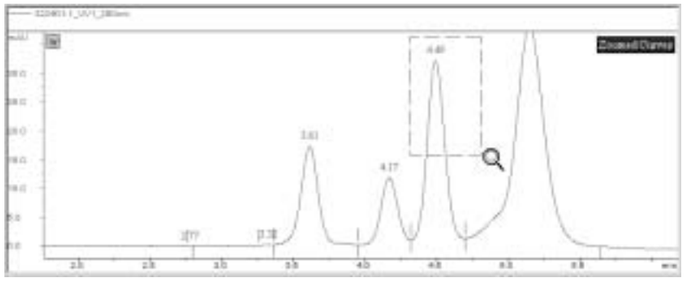
3. 保存するレイアウトに名前をつけ、**OK**をクリックします。初期設定にするには**Save as default**をチェックします。

4. **OK**をクリックします。

### 14.2.6　ズームアップ

カーブの任意の範囲をズームアップできます。

1. ズームアップしたい範囲にカーソルを移動します。
2. **マウスの左ボタン**を押さえたまま、マウスを移動します。
3. 点線が表示されますので、その点線でズームアップしたい範囲を囲います。

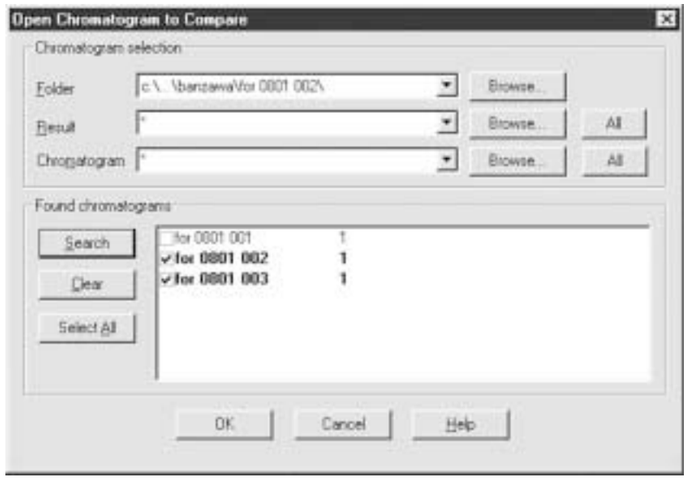


4. キーボードの**Page Down**でズームイン、**Page Up**でズームアウトになります。
5. ズームアップを解除するには、カーブウィンドウで**マウスの右ボタン**をクリックします。
6. メニューより**Reset zoom**をクリックします。

### 14.2.7　他のクロマトグラムとの比較

**・検索してクロマトグラムを一括で表示する場合**

1. **File** ↓　**Open to compare**　→　**Chromatograms...**をクリックします。




2. **Chromatogram selection**で比較するクロマトグラムの検索ができます。
3. 検索項目を絞る場合は**Browse...**を選択し指定します。
4. ＊（アスタリスク）を指定すると全ての項目の指定になります。

**指定のしかた**
**iex**　：ファイル名IEXを検索します。
**iex***　：iexで始まるファイル名を検索します。
***iex**　：ファイル名の最後がiexのファイルを検索します。
**?iex**　：4文字でファイル名の最後がiexのファイルを検索します。



5. **Search**をクリックします。
6. 検索結果がリスト表示されるので、表示したいクロマトグラムをチェックし、指定します。
7. **OK**をクリックすると、クロマトグラムが表示されます。

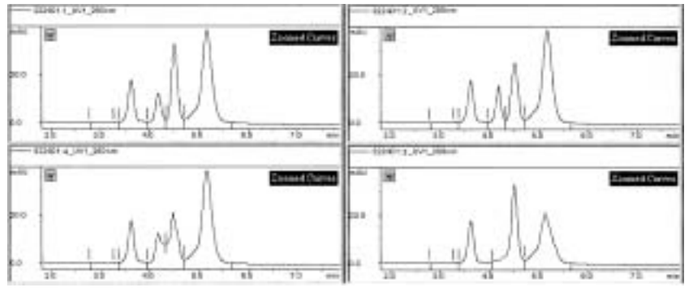
**・クロマトグラムを一つずつ選択する場合**

1. **File** ↓　**Open**　→　**Chromatograms**をクリックします。

2. 表示したいResultファイルをクリックします。
3. **Available chromatograms**に**1**と表示されます。**1**をチェックして指定し**Select>>**をクリックします。
4. 表示したいカーブの分だけ2～3を繰り返します。
5. **OK**をクリックします。

### 14.2.8　複数のクロマトグラムの画面表示

1. メニューバーより、
**Windows**　↓　**Tile**（タイル張り表示）
または
**Windows**　↓　**Cascade**（カスケード表示）
を選択します。



2. Openしたクロマトグラムのレイアウトを同じにしたい場合は、レイアウトを指定したクロマトグラムのウィンドウにカーソルを移動し、**マウスの右ボタン**をクリックします。

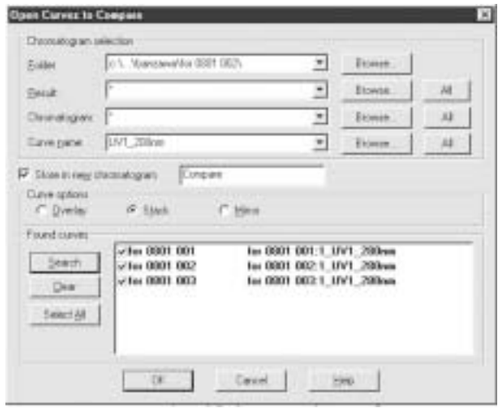
3. メニューより、**Properties**を選択します。

4. **Chromatogram Layout**のウィンドウの左下の**Apply to all chromatograms**をチェックし、**OK**をクリックします。

## 14.2.9　カーブの比較

**・検索して一括でカーブを表示する場合**

1. **File　↓　Open to compare　→　Curves**
   **Open Curves to Compare**のウィンドウが表示されます。




2. **Chromatogram selection**で比較するクロマトグラムの検索ができます。

3. 検索項目を絞る場合は**Browse...**を選択し指定します。

4. ＊（アスタリスク）を指定すると全ての項目の指定になります。

   **指定のしかた**
   **UV＊**　　：UVカーブ全て検索します。
   **UV1_280＊**　：UV1_280で始まるカーブを検索します。

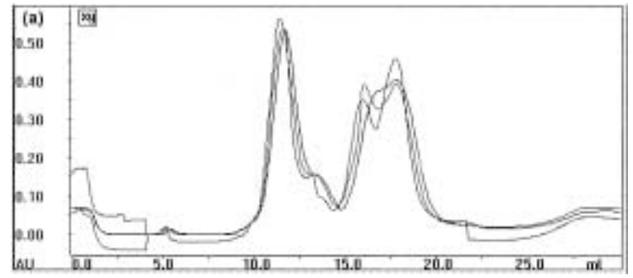
5. **Search**をクリックします。

6. 検索結果がリスト表示されますので、表示したいクロマトグラムをチェックし、指定します。

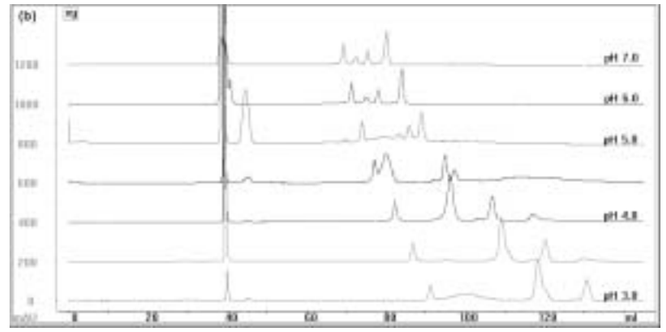
7. 検索したカーブを別のウィンドウに表示したい場合は、**Store in new chromatogram**をチェックし、ウィンドウ名を入力します。



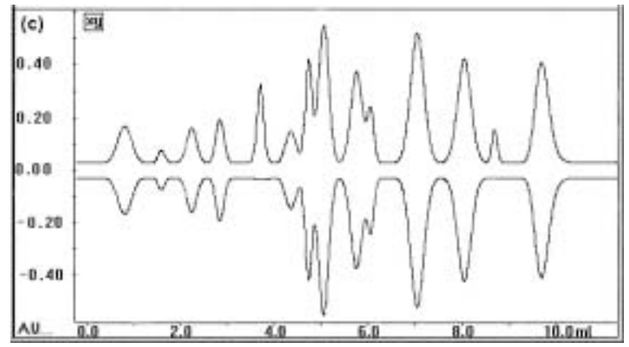
8. **Curve options**でカーブの表示のしかたを選択できます。
   **Overlay** 同じ軸で重ね書き表示




**Stack**　等間隔にシフトして表示



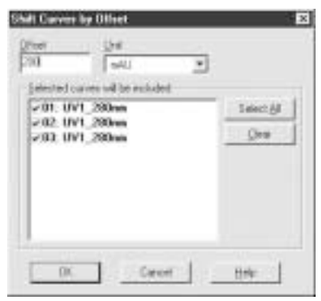

**Mirror**　鏡像表示




9. **OK**をクリックすると、クロマトグラムが表示されます。

10. **Stack**を選択した場合は、**Shift Curves by Offset**ウィンドウが表示されます。**Offset**する値の変更ができます。

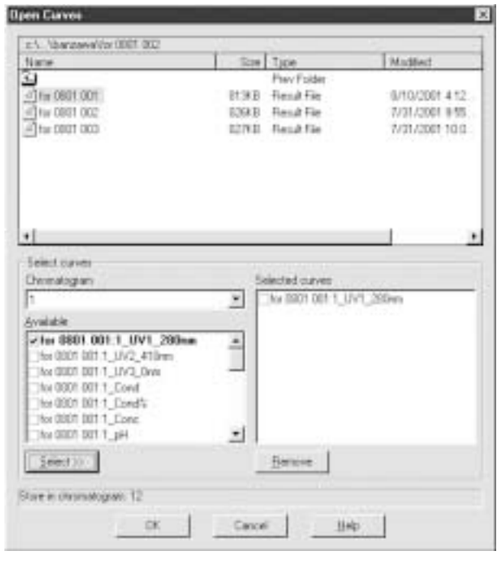
11. Y軸の単位の異なるカーブの場合は、カーブ毎に**Shift Curves by Offset**ウィンドウが表示されます。



・表示されたウィンドウにカーブを呼び出す場合

1. 呼び出したいウィンドウをクリックし、アクティブにします。（ウィンドウのタイトルが青色）

2. **File** ↓ **Open** → **Curve**




3. フォルダーをクリックし選択します。

4. 選択するファイルをクリックします。

5. ファイル内のカーブのリストが表示されます。

6. リストの中からカーブをチェックして選択し、**Select>>**をクリックします。

7. 比較したいカーブだけ、3～6を繰り返します。

8. **OK**をクリックします。



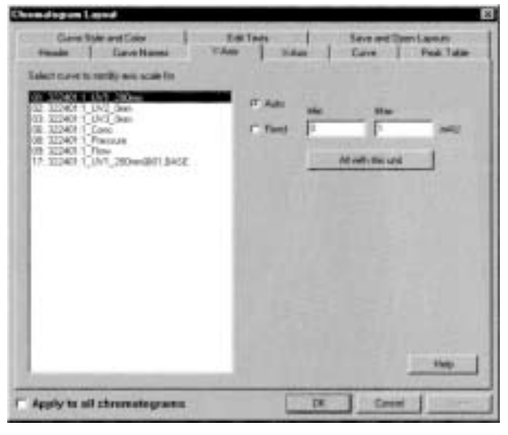
・表示したカーブを同じスケールで表示する場合

1. 表示されたウィンドウにカーソルを移動し、**マウスの右ボタン**をクリックします。

2. メニューから**Properties**を選択します。

3. **Chromatogram Layout**ウィンドウが表示されます。

4. **Chromatogram Layout**のウィンドウより、**Y-Axis**ページをクリックします。




5. 軸の指定をしたいカーブをクリックし選択します。

6. 指定したカーブのスケール表示を、**Fixed**（固定軸表示）で表示します。

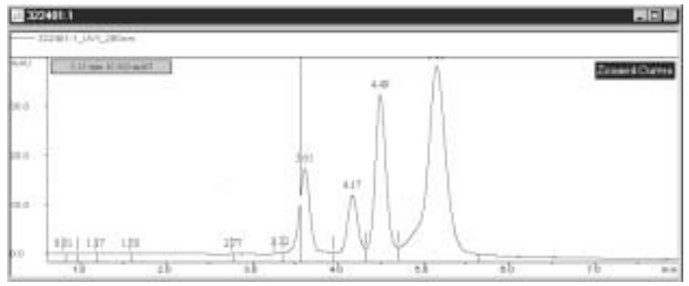
7. **All with this unit**をクリックします。

8. **OK**をクリックします。

## 14.2.10　リテンションタイムとピーク高さの測定

1. カーブウインドウ上で**マウスの右ボタン**をクリックし、メニューの中から**marker**を選択します。
アクティブXYボックスのテキストの色は、表示しているカーブと同じ色で表示されます。

2. カーソルが表示されます。



3. カーソルがある位置の、カーブのリテンションタイムとピーク高がボックスに表示されます。カーソルをクリック＆ドラッグして、値を表示したい位置までカーソルを移動します。

4. 表示する値を変更する場合は、ボックスをクリックします。アクティブXYボックスの表示された値の色は、カーブの色と同じ色で表示されます。

5. **マウス右クリック**でメニューを表示し、**marker**をクリックし終了します。

### 14.2.11　クロマトグラムのテキスト入力

**・テキストの入力**

1. クロマトグラムウィンドウにマウスのポインターを置きます。**マウスの右ボタン**をクリックしてメニューより**Add Text**を選択します。

2. ポインターが**abc**ポインターに変わります。

3. **abc**ポインターをテキスト入力したい場所に移動し、**マウスの左ボタン**をクリックします。

4. ＜text＞という字が表示されたら、＜text＞の位置に入力したいテキストをキーボードよりタイプアップし、カーソルをテキストボックス以外のところへ移動しクリックします。

5. テキストボックスが表示されている間は、文字挿入位置をクリック＆ドラッグで移動できます。

**・テキストの変更・削除**

1. カーブウィンドウ上で**マウスの右ボタン**をクリックし、表示されるメニューの中から**Edit Text Mode**を選択します。

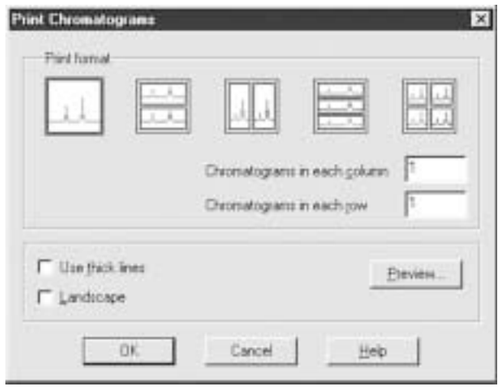
2. テキストの変更または削除を実行します。このとき、文字の上で**マウスの右ボタン**をクリックすると、フォントの変更ができます。

3. 右クリックし、**Edit Text Mode**をもう一度選択すると、テキストが決定されます。

## 14.3　クロマトグラムのプリントアウト

クロマトグラムのプリントは、以下の手順で操作してください。
画面に表示されている複数のクロマトグラムを一枚の紙にプリントしたい場合は、
**＜レイアウト変更の例＞**をご参照ください。

1. 表示されているクロマトグラムをプリントアウトします。
   **File** ↓ **Print**を選択し、**Print Chromatograms**ウィンドウを表示します。




2. **Print format**を選択します。

3. 太いラインでプリントアウトしたい場合は**Use thick lines**をチェックします。

4. **Preview**をクリックすると**Customise Report**画面が表示され、ここでプリントアウトのプレビューが確認できます。**Exit**ボタンでプレビューを終了します。
   （この画面からレイアウトの変更およびレポートフォーマットとしての保存も可能です。詳細は次頁**＜レイアウト変更の例＞**をご参照ください）

5. **OK**をクリックします。



### ＜レイアウト変更の例（1枚に複数クロマトグラムをプリントする）＞

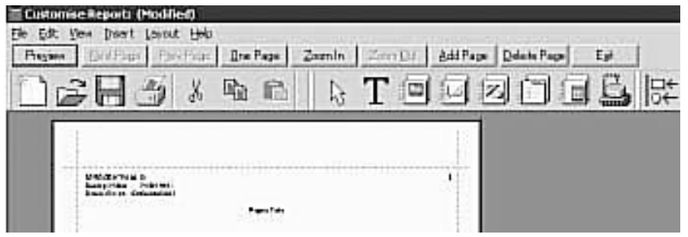
ここでは変更の例として、複数クロマトグラムを一枚の紙にプリントするためのクロマトグラムレイアウト変更の手順を示します。
前項14.3 クロマトグラムのプリントアウトの手順5で表示させたCustomise Report画面からは、Edit modeボタンをクリックすることで、レイアウトの編集がはじめられます。

1. **Result**ファイルをどれか1つOpenします。
   **File** ↓ **Open** → **Result**

2. **File** ↓ **Print**を選択し、**Print Chromatograms**画面を表示します。

3. **Preview**ボタンをクリックして**Customise Report**画面を表示させ、さらに**Edit Mode**ボタンをクリックします。

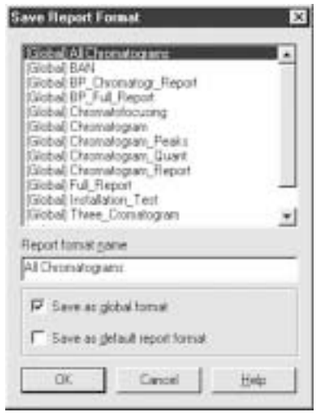
4. 表示されているクロマトグラム上にポインターを移動し、**マウスの右ボタン**をクリックします。




5. 表示されるメニューの中から**Properties**を選択すると**Setup Chromatogram**画面が現れます。

6. **Selected chromatogram(s)** の選択肢から**All Chromatograms**を選択し、**OK**ボタンをクリックします。

7. **File** ↓ **Save as...**でレポート名をタイピングし（例；**All Chromatograms**）、**Save as global format**にチェックを入れて**OK**ボタンをクリックします。



8. **Customise Report**画面に戻りますので、**Exit**ボタンをクリックします。

9. **Print Chromatograms**画面に戻りますので、これも**Cancel**します。

10. これで**All Chromatograms**という名のレポートフォーマットが保存されました。

11. このフォーマットを使用して複数のクロマトグラムを一枚の紙にプリントするには、目的枚数のクロマトグラムを表示させたうえで（14.2.8　複数のクロマトグラムの表示参照、P.99）、**File　↓　Report**の**Format**から［**Global**］**All Chromatograms**を選択し、**Print　→　OK**をクリックします（14.4 レポート機能を使う の項参照）

## 14.4　レポート機能を使う

レポートを使用すると、実行したメソッドの内容、実行時の記録（Run Log）などをクロマトグラムと共にプリントアウトできます。
あらかじめ数種類のフォーマットが登録されていますが、好みのスタイルにカスタマイズし、保存することも可能です。

### 14.4.1　既存レポートフォーマットを使用する

1. **File　↓　Report...**

2. **Generate Report**ウィンドウが表示されます。

3. フォーマットを選択します。

4. ここで**Print**ボタンをクリックすると、選択したフォーマットでプリントされます。
（Reportの内容は、**Preview**ボタンをクリックすると表示される**Customize Report**画面にて確認することができます。）

### 14.4.2　レポートのレイアウトの変更

1. **File　↓　Report...**

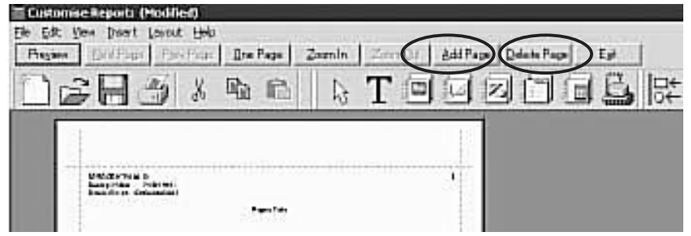
2. **Generate Report**ウィンドウが表示されます。

3. フォーマットを選択します。

4. **Generate Report**ウィンドウの**Edit**ボタンをクリックします。



5. **Add Page, Delete Page**ボタンで必要レポート枚数の指定をします。




6. メニューの**Insert**から挿入したいオブジェクトを選択し、ページエリア上でクリックすることで配置できます。

7. クロマトグラムのレイアウト設定を変更するには、クロマトグラム上で**マウスの右ボタン**をクリックして**Properties**から**Setup Chromatogram**を表示させます。

8. **Settings**の**Layout**で**Current**のチェックを解除し**Define**ボタンを押すと、表示するカーブの選択ができます。また、**Y-Axis**ページではY軸4つまでが指定できます。

9. **Fonts**でフォントの設定が可能です。

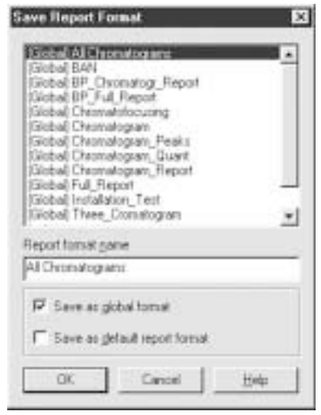
10. 必要な項目の設定後**OK**をクリックし、**Preview**をクリックして画面を確認します。

### 14.4.3　レポートフォーマットの保存

カスタマイズしたレイアウトのフォーマットを保存できます。

1. **Save As**ボタンをクリックし、フォーマット名を入力します。

2. **Save as global format**または**Save as default report format**をチェックします。




3. **OK**をクリックします。

4. **Exit**をクリックします。

5. **Close**でウィンドウを閉じます。

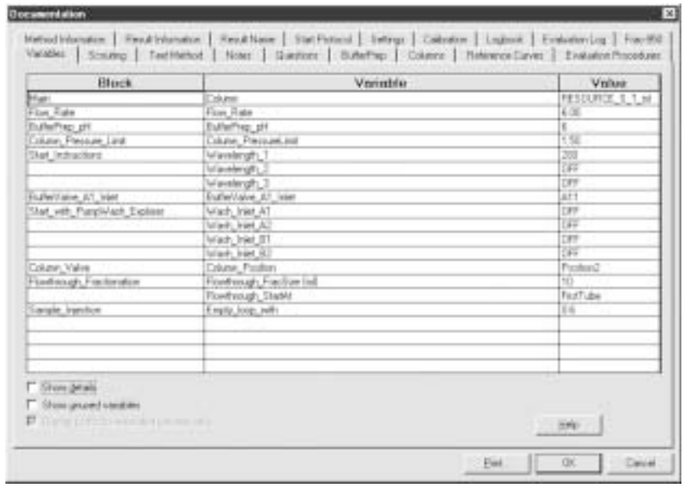
## 14.5　Resultファイルに保存される文書

実行したメソッドの内容やメソッド実行時の記録等が確認、プリントアウトできます。

1. **View** ↓ **Documentation**をクリックします。
2. 内容をプリントアウトする場合は**Print**ボタンをクリックし、プリントアウト項目を選択し**OK**をクリックします。

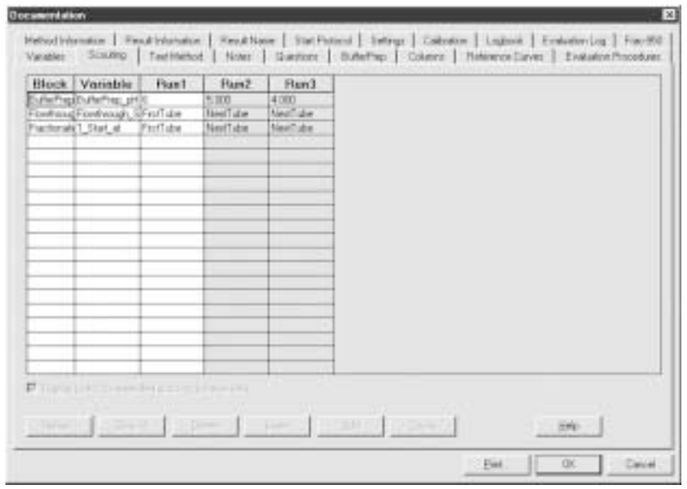
### Variables

メソッド実行時に使用したパラメータが表示されます。




### Scouting

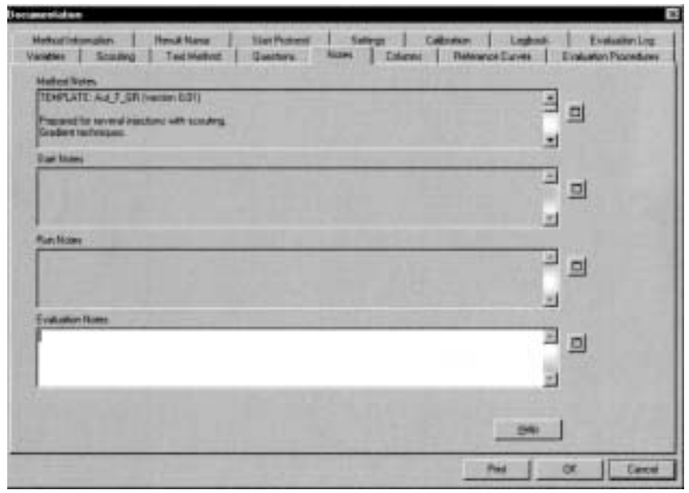
スカウティング内容が表示されます。今選択している**Result**ファイルの値は黄色いセルで表示されます。





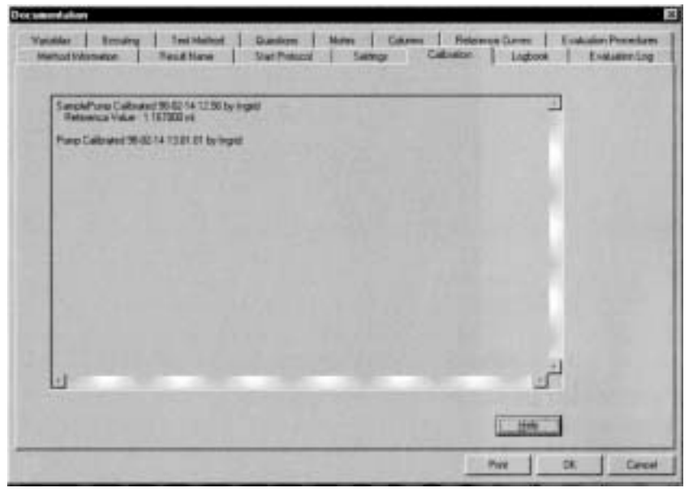

### Notes

**Notes**で入力した内容が表示されます。**Evaluation Notes**でコメントを入力することもできます。

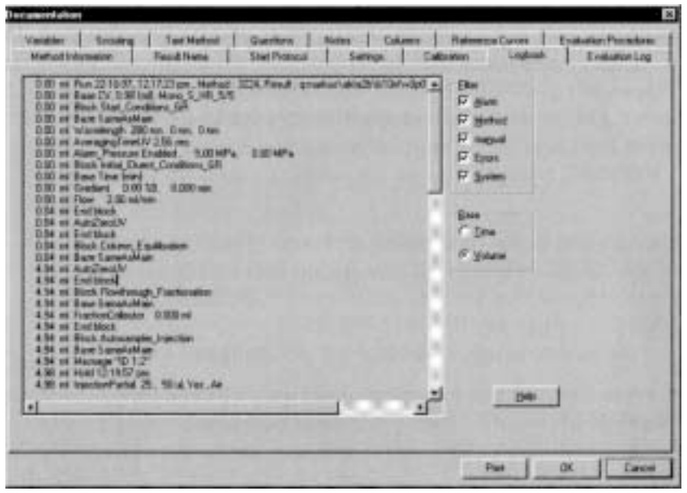



### Calibration

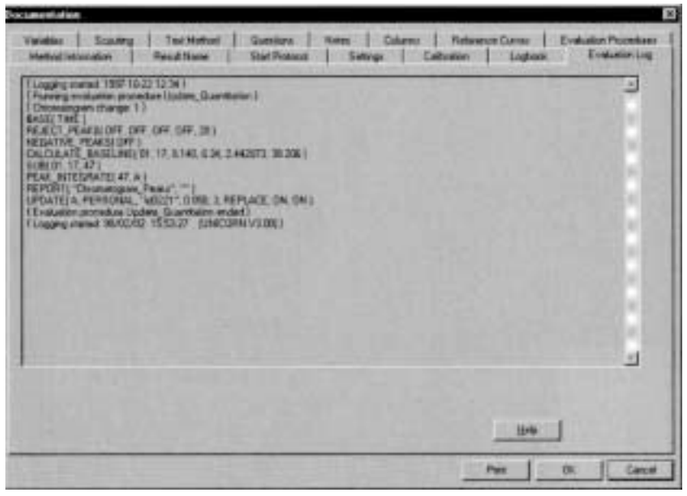
いつ、誰がキャリブレーションしたか表示されます。



**Logbook**　メソッド実行時の出来事が表示されます。アラーム、メソッド、マニュアル変更内容、エラー内容とシステムの情報が表示できます。



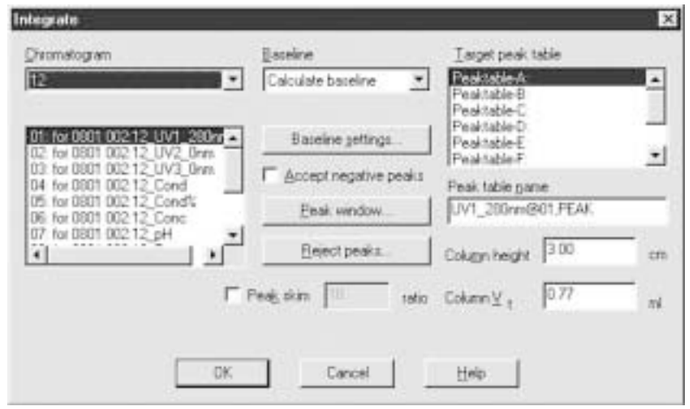
**Evaluation Log**　メソッド終了時に実行した**Evaluation procedures**の内容が表示されます。



## 14.6　面積計算（Integrate）

### 14.6.1　面積計算（Integrate）

1. **Integrate** ↓ **Peak Integrate**

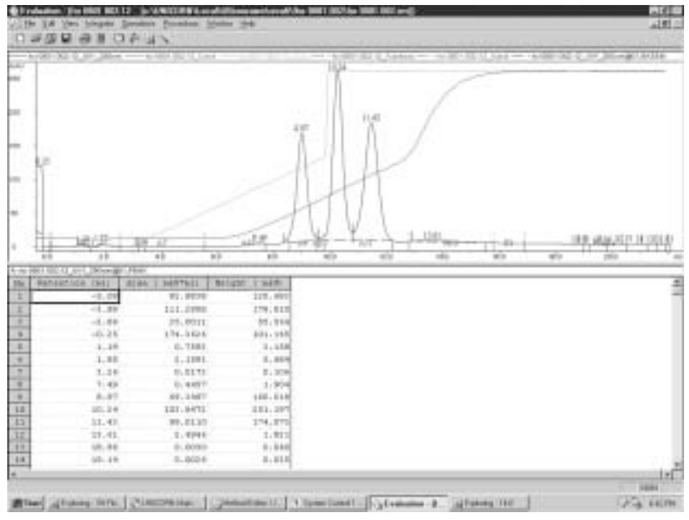



2. 面積計算したいカーブを指定します。

3. **Target peak table**で計算結果を保存するピークテーブル（A-H）を指定します。

4. **Baseline**でベースラインの選択をします。**Calculate Baseline**を選択すると、自動計算されます。

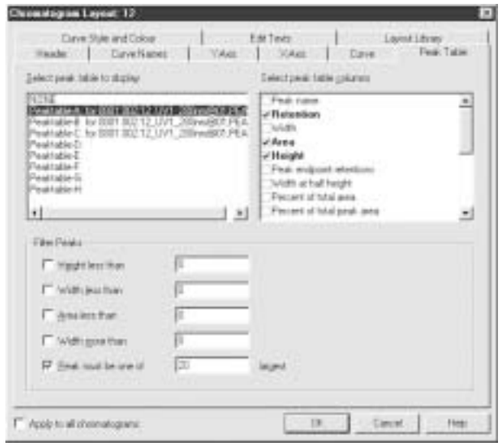
5. **OK**をクリックしてください。計算結果が表示されます。



### 14.6.2　ピークテーブル表示

ピーク面積の表示されたウィンドウの表示を選択できます。

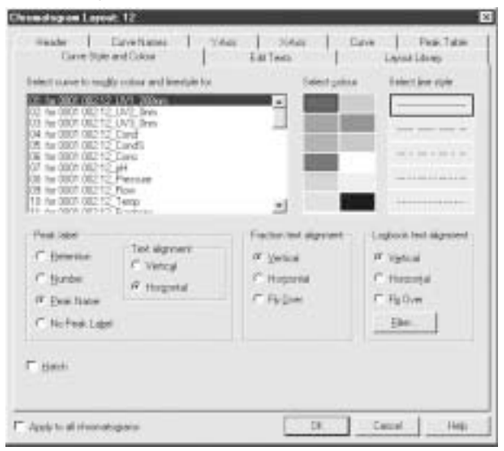
1. 表示されたウィンドウにカーソルを移動し、**マウスの右ボタン**をクリックします。
2. メニューから**Properties**を選択します。
3. **Chromatogram Layout**ウィンドウが表示されます。
4. **Peak Table**ページを指定します。



5. **Select peak table columns**より表示したい項目を指定します。
6. **OK**ボタンをクリックします。

### 14.6.3　ピークラベルの変更

1. 表示されたウィンドウにカーソルを移動し、**マウスの右ボタン**をクリックします。
2. メニューから**Properties**を選択します。
3. **Chromatogram Layout**ウィンドウが表示されます。
4. **Curve Style and Color**ページをクリックします。



5. **Retention, Number, Peak Name, No Peak Label**の選択ができます。



### 14.6.4　ピークの表示

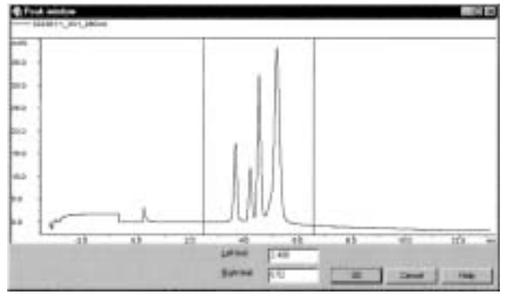
表示するピークの選別、制限ができます。

1. 表示されたウィンドウにカーソルを移動し、**マウスの右ボタン**をクリックします。
2. メニューから**Properties**を選択します。
3. **Chromatogram Layout**ウィンドウが表示されます。
4. **Peak Tables**ページをクリックします。
5. **Filter Peaks**で表示するピーク高さ、幅や、表示ピーク数の制限ができます。
6. **OK**をクリックします。

### 14.6.5　Peak Integrateの至適化

1. メニューバーより
   **Integrate** ↓ **Peak Integrate**
2. **Reject peaks**ボタンをクリックします。**Peak Integrate**の際、ピーク高さ、幅、表示ピーク数の制限ができます。

3. 面積計算させる領域を指定する場合は、**Peak window**ボタンをクリックします。



4. **Peak window**が表示されます。
5. 面積計算させる領域をカーソルで指定します。または**Left limit**と**Right limit**で入力することもできます。
6. **OK**をクリックします。
7. 負のピークも計算させたい場合は、**Accept negative peak**をチェックし、**OK**をクリックします。

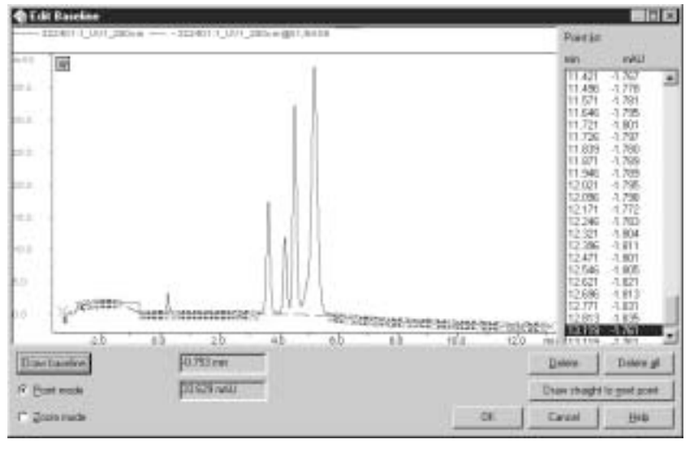
### 14.6.6　ベースラインのマニュアル編集

ベースライン自動計算後にベースラインポイントの追加または削除し、新たにベースラインを引くことができます。

1. **Integrate　↓　Edit Baseline**

2. ベースラインが2つ以上保存されている場合は、**Select Baseline to Edit**画面が表示されます。はダイアログからベースラインを選択し、**OK**をクリックします。

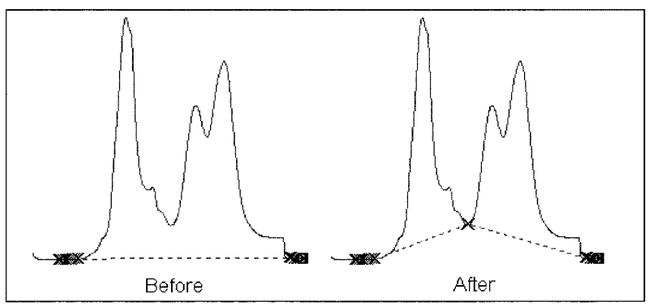
3. カーブとベースラインが表示されます。ベースラインのポイントと**Point list**も表示されます。




**・ベースラインデータポイントの挿入**

**Point mode**ボタンを選択します。クロマトグラムに新たなベースラインポイントを追加するには、追加したい場所で**マウスの左ボタン**をクリックします。**Point list**にベースラインポイントが追加されます。

**Zoom mode**ボタンを選択すると、クロマトグラムのある領域を拡大することができます。ズームアップを解除するには、**マウスの右ボタン**をクリックし、メニューより**Undo zoom**または**Reset zoom**をクリックします。






**・ベースラインデータポイントの削除**

**Point List**からデータポイントを削除したい場合、削除したいポイントをリストから選択し、**Delete**ボタンをクリックします。または、リストの中の削除したいポイントをダブルクリックします。
**Delete all**は全てのポイントを削除します。

**・新しいベースラインの引き方**

ベースラインポイントの選択が終了したら、**Draw baseline**ボタンをクリックします。新しいベースラインカーブが引かれます。

2点間を直線のベースラインで引きたい場合は、ポイントリストより2点の最初のポイントを選択し、**Draw straight to next point**ボタンをクリックします。

**OK**をクリックすると、**Edited Baseline**という名前で保存されます。このベースラインで新たなピーク面積計算をすることができます。

**OK**をクリックします。

### 14.6.7　ピークリミットの調整

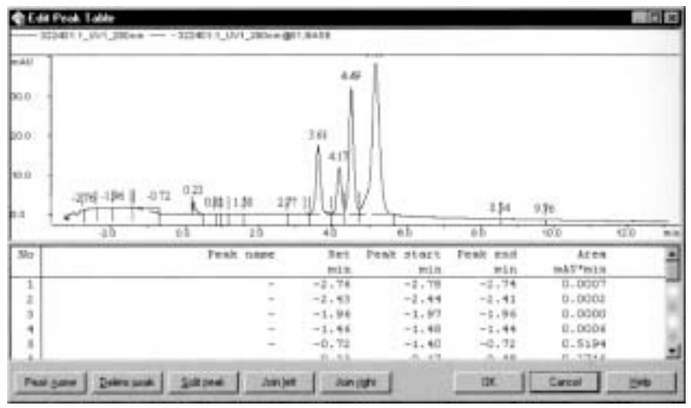
ピーク面積計算後に、ピークの分離・結合や、マニュアルで、ピークのスタート・エンドポイントの調整ができます。

1. **Chromatogram Layout**ダイアログの**Curve Style and Colour**ページをクリックし、ピークにラベリングするのを**Number**または**Retention**のどちらにするかを選択します。

2. **Integrate　↓　Edit Peak Table**を選択します。複数のピークテーブルが存在する場合は**Select Peak table to Edit**画面が表示されます。

3. リストの中から希望するピークテーブルをダブルクリックするか、または**OK**をクリックします。選択したピークテーブルとクロマトグラムウインドウが表示されます。ズームも使用できます。

4. 変更したら**OK**をクリックし、新しいピークテーブルを確認します。



### ・ピークテーブルのピークの削除

ピークテーブルからピークを削除する場合は、クロマトグラムまたはピークテーブルのピークをクリックし、**Delete peak**ボタンをクリックします。

### ・ピーク分離

ピークの左と右に引かれたドロップラインの間の範囲が、ピークとして認識しています。2つのピークに分離することができます。分離するには、分離したいピークをリストから選択、またはカーブにチェックし、**Split Peak**ボタンをクリックします。

### ・ピークの結合

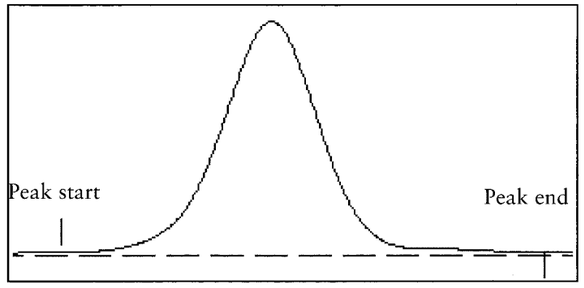
ドロップラインで分離された隣り合ったピークを結合することができます。

1. クロマトグラムまたはピークテーブルのピークを選択します。

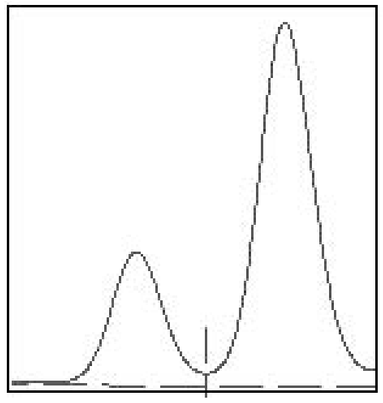
2. **Join left**または**Join right**をクリックします。

### ・ピークスタートとエンドポイントの調整

各ピークのスタートとエンドはカーブにドロップラインでチェックできます。




隣合うピークの場合、最初のピークの終わりのポイントが、次のピークの始まりのポイントになります。



選択したピークのスタートとエンドのドロップラインを移動させることができます。

1. カーブまたはピークテーブルの中から興味あるピークをクリックします。2つのカーソルバーは選択されたピーク範囲の左と右のドロップラインに重なります。

2. 左と右のドロップラインのバーをドラッグし、選択したピークの新しい左と右の境界に移動します。ドロップラインは他のドロップラインを越えて移動出来ません。新しいドロップラインで、自動的にピーク面積されます。

3. 前か後のピークのドロップラインも同様に調整されます。ドロップラインはベースラインポイントを越えて移動出来ません。



### ・ピーク名表示

1. クロマトグラムよりピークをダブルクリックします。

2. **Edit Peak Name**画面が表示されます。**Peak name**を入力し、**OK**をクリックします。

3. 1～2の操作をくり返します。

4. **OK**をクリックします。

5. カーブウィンドウで**マウスの右ボタン**をクリックします。

6. **Properties**をクリックし、**Chromatogram Layout**の**Curve Style and Color**ページをクリックします。

7. **Peak label**で**Peak Name**を選択すると、クロマトグラムにピーク名が表示されます。

8. **OK**をクリックします。

## 14.6.8　カラムの理論段（HETP）

1. 理論段を計算したいカラムに少量のアセトン（5 mg/ml、カラムのベットボリュームの0.1 %）をインジェクションしたクロマトグラムを表示します。

2. **Integrate**ダイアログで、カラム高さ（cm）を確認し、ピーク面積計算します。

3. **Chromatogram Layout**ダイアログの**Peak Table**ページのリストの中から**Plate hight（HETP）**を選択します。

パッキングの良いカラムは、狭いピークになり**HETP**は低い値になります。パッキングの良くないカラムは、ブロードなピークになり**HETP**は高い値になります。

**HETP**（height equivalent to a theoretical plate）**の計算**

HETP = L / N

$N = 5.54^{*}(VR/Wh)^{2}$　assuming a Gaussian peak

N = 理論段数
L = ベット高さ（cm）
VR = 溶出ピークのリテンションボリュームまたはタイム
Wh = VRと同じ単位でのピークの半値幅

## 14.7　フラクションの塩濃度

各フラクションの塩濃度を計算することができます。
注：コンダクティビティシグナルは0.3M以上ではリニアではありません。

1. **Operations　↓　Fraction histogram**を選択します。左のリストから**Cond**カーブを選択します。フラクションカーブはすでに選択されています。**OK**をクリックします。

2. カーブウィンドウにカーソルを移動し、マウスの右ボタンをクリックします。表示されるメニューから**Marker**を選択します。

3. 画面左上のボックスをクリックし、**Cond**カーブと同じ色にします。

4. カーソルをドラッグし、フラクションのコンダクティビティの値をボックスで確認します。

> 注：**Cond**カーブのかわりに**UV**カーブ（280nm）を選択すれば、フラクション毎の平均吸光度を計算できます。

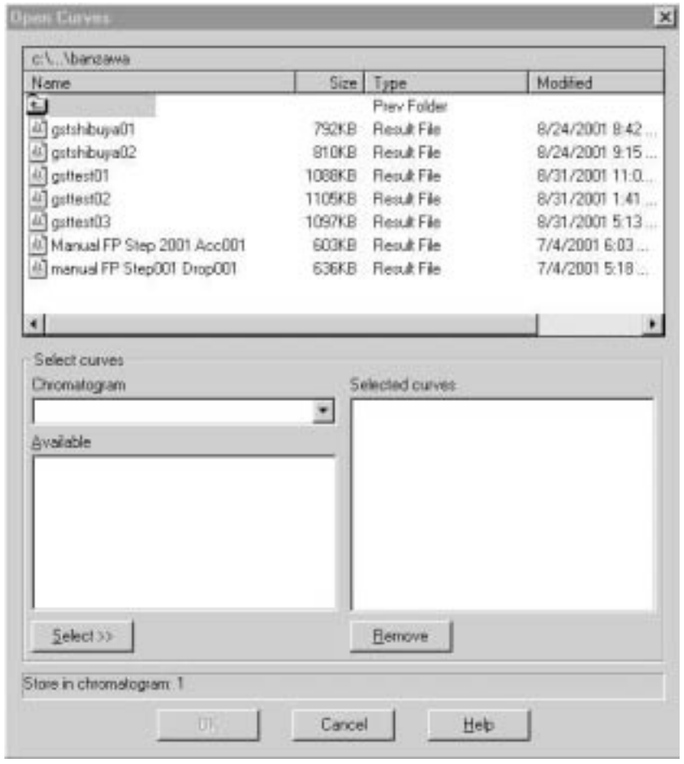
## 14.8　ブランクランカーブの引き算

ベースラインがドリフトする場合やゴーストピークがある場合は、ブランクランを行ってサンプルのカーブから引き算し、ベースライン補正します。ブランクランとサンプルランの平衡化のボリュームを同じにすると、ゴーストピークの高さが同じになります。

### ・ブランクランカーブの呼びだし

1. ブランクランカーブを呼びだすウィンドウをクリックしアクティブウィンドウにします。

2. **File** → **Open** → **Curves**を選択します。**Open Curves**ダイアログが表示されます。




3. ブランクランの**Result**ファイルをダブルクリックします。

4. ブランクランカーブを選択し**Select**ボタンをクリックします。
**Selected curves**リストに選択したカーブが表示されます。

5. リストからカーブを除きたい場合は**Remove**をクリックします。

6. **OK**をクリックします。

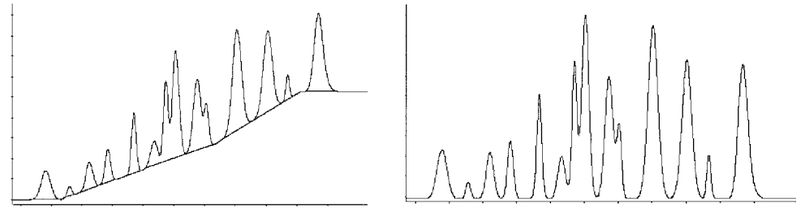


### ・ブランクランカーブの引き算

1. **Operation** → **Subtract**を選択します。

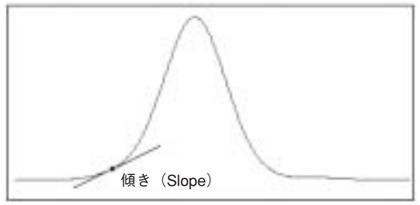
2. サンプルのカーブからブランクランのカーブを引き算します。

3. **OK**をクリックします。



## 14.9　ピークフラクショネーションのSlope値

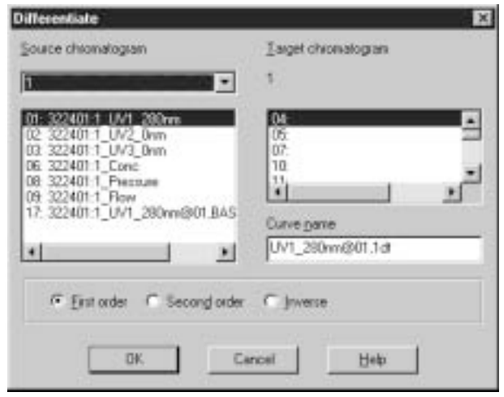
ピークフラクションをする場合カーブの傾き（**Slope**）でピーク認識します。




予備測定できる場合は、事前にクロマトグラムのデータをとります。そのクロマトグラムよりカーブの傾き（**Slope**）を算出します。

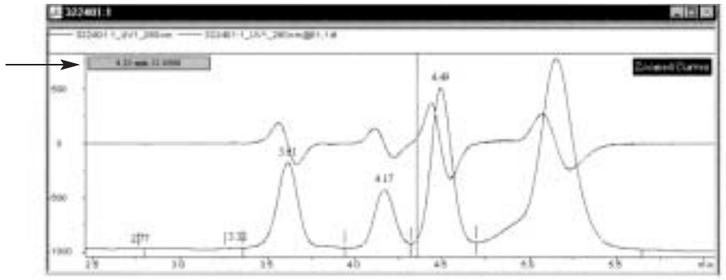
1. 傾き（**Slope**）を計算させたいカーブを表示し、**X軸**をクリックしてTime軸（**min**）にします。

2. **Operations** → **Differentiate**を選択します。ピークフラクショネーションしたいUVカーブを選択し、**First order**を選択し**OK**をクリックします。




3. マウス右クリックで表示されるメニューから**Marker**をクリックし、カーソルを表示します。

4. ピーク取りを始めたい場所までカーソルをドラッグし、その時のSlope値をXYボックスより読み取ります。（ボックスをクリックし、文字色をslopeのカーブ色にあわせてください）



5. 同様にピーク取りを終わりたい場所までカーソルをドラッグし、その時のSlope値をXYボックスより読み取ります。

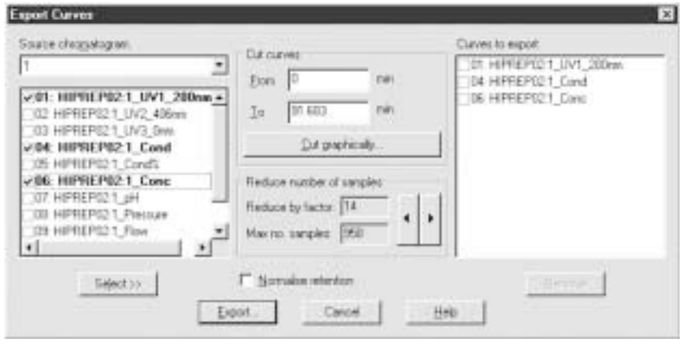
6. **Slope**の値を**Method Editor**の**Peak_FracParameters**で入力します。

## 14.10　結果のExport（テキストデータ出力）

データは、**ASCII**（テキスト）と**Lotus1-2-3™**（WKS）フォーマットで保存することができます。

1. タスクバーより**Evaluation**を選択します。

2. **File** ↓ **Export** → **Curves**




3. **Source chromatogram**でカーブをクリックしチェックして指定します。

4. **Cut curve**で**Export**するカーブの範囲を指定できます。

5. **Reduce number of samples by factor:**で**Export**するデータポイントの制限ができます。 **factor**を大きくするとデータポイントを減らすことができます。

6. **Select**をクリックし、**Export**をクリックし、ファイル名を入力します。

7. **Save in**でファイルの保存先を指定します。フロッピーディスクにデータを保存する場合は（3 1/2 Floppy［A］）、フォーマット（DOS V）したフロッピーディスクをフロッピードライブに挿入しておきます。

8. **OK**をクリックします。



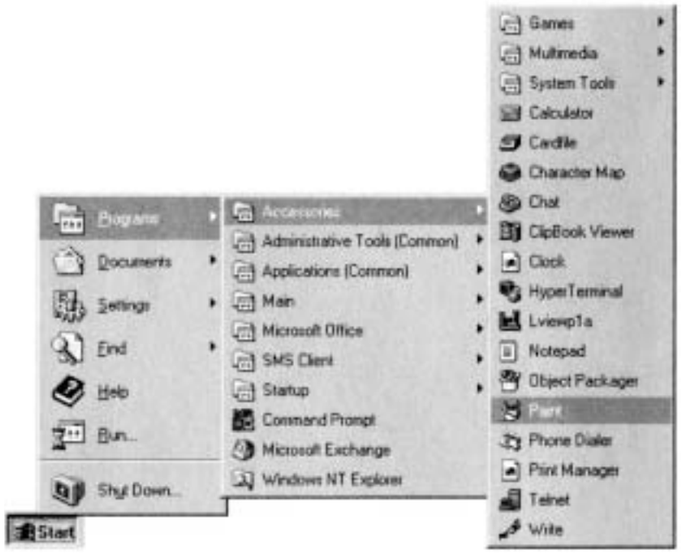
## 14.11　クロマトグラムをクリップボードにコピーする（画像データ出力）

Evaluationで表示されたクロマトグラム（アクティブウィンドウ）をクリップボードにコピーすることができます。クリップボードにコピーされたクロマトグラムは、他のソフト（例：Microsoft Word™）にペースト（**Paste**）することができます。

1. コピーしたいクロマトグラムのウィンドウをクリックしアクティブウィンドウにします。（ウィンドウのタイトルバーが青色）

2. メニューバーより**Edit** ↓ **Copy to clipboard**を選択します。

3. Windows NTより、**Paint**などのソフトを起動させ、**Paste**します。



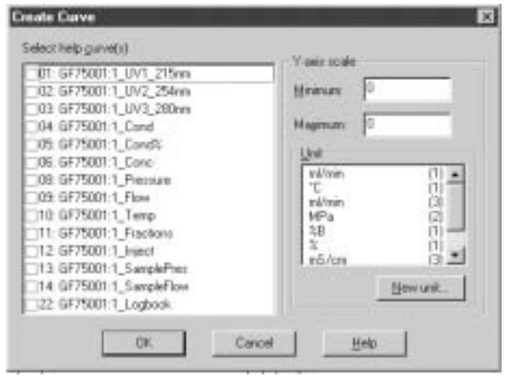

## 14.12 活性カーブの作成

フラクション回収後、各フラクションにおける活性の値を入力してカーブ表示することができます。

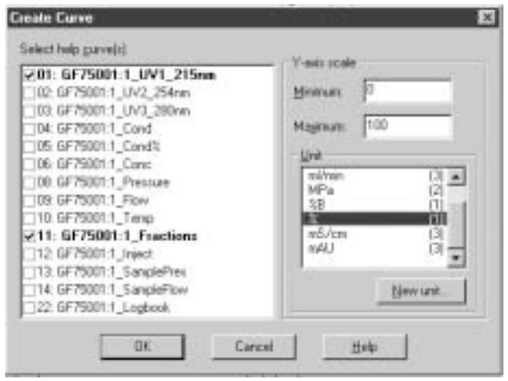
**Evaluation**モードより

1. **Operations** ↓ **Create Curve…**

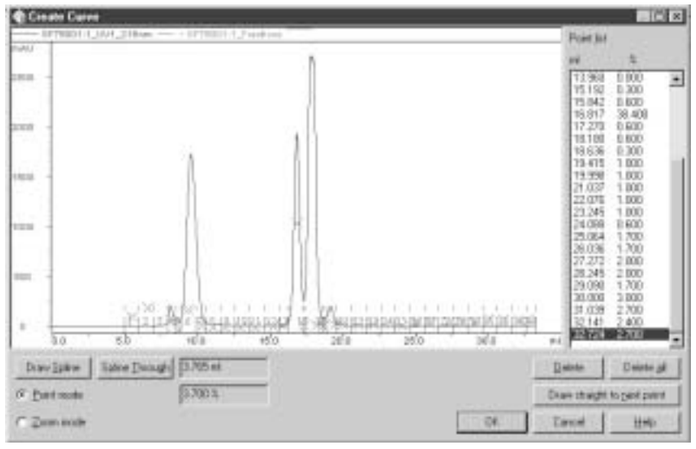
2. 活性カーブを描くためのヘルプカーブを指定します。




3. 活性カーブのY軸のスケールと単位を指定し、**OK**ボタンをクリックします。

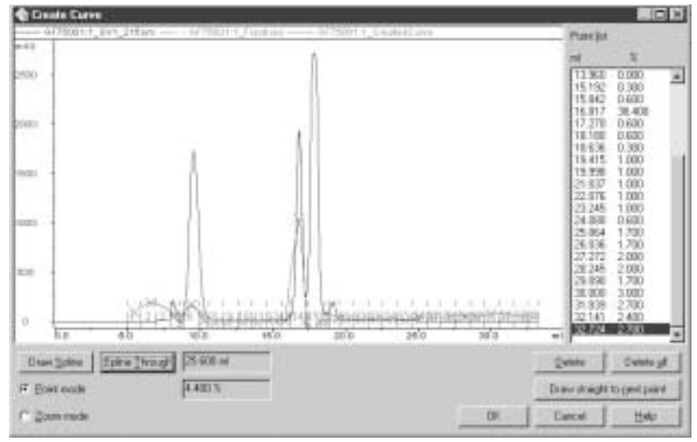



4. カーソルで入力したいポイントにポインターを移動させ、クリックします。





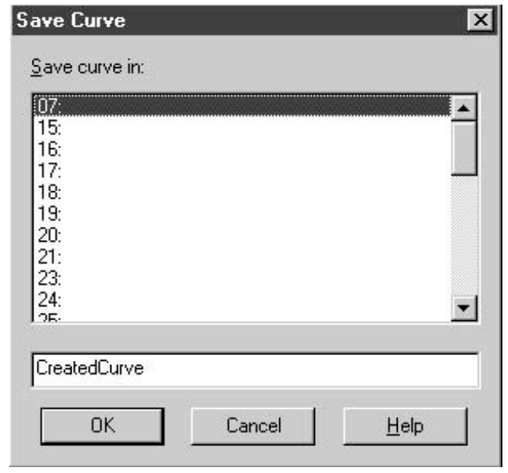

5. **Draw spline**または**Spline Though**ボタンをクリックします。




6. 折れ線したい場合はポイントリストの先頭をクリックし、ハイライトにします。**Draw straight to next point**ボタンをクリックします。

7. **OK**ボタンをクリックします。

8. 活性カーブの名前を入力し、**OK**ボタンをクリックします。



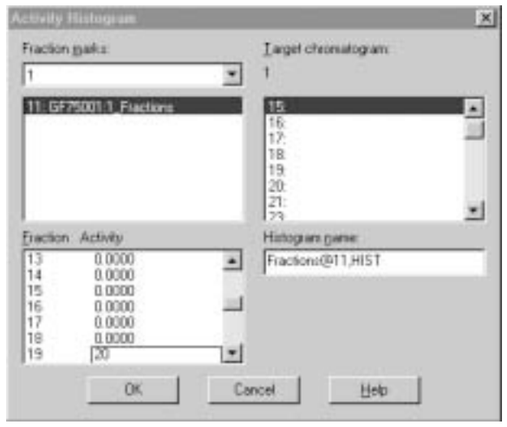
## 14.13 ヒストグラムの作成

フラクション回収後、各フラクションにおける活性の値を入力し、ヒストグラム（棒グラ）表示することができます。

**Evaluation**モードより

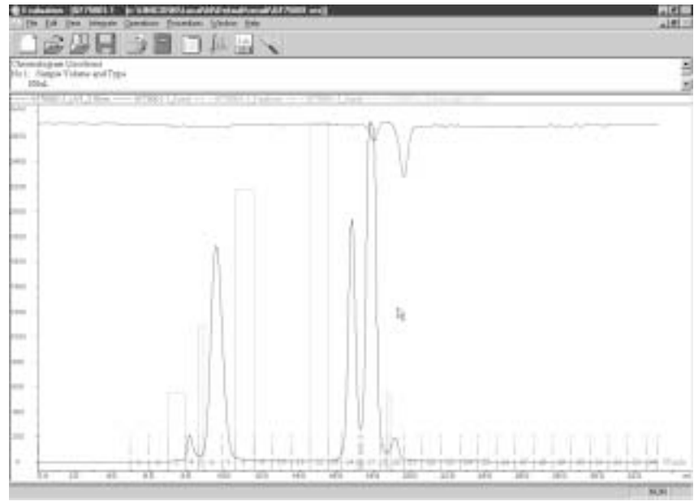
1. **Operations　↓　Activity Histogram…**

2. **Fraction Activity** より各フラクションの活性値を入力します。




3. **OK**ボタンをクリックします。

4. **マウスの右ボタン**をクリックし
   **Properties　→　Curve Style and Colour**
   ヒストグラムの色と線の選択をします。



# 15. システム終了

まず脱気した超純水で流路を洗浄します。システムは2日以上使用しない場合は、20%エタノールで置換して保存します。インレットチューブA11、A2、B1、B2を脱気した超純水に接続します。

## 15.1　ポンプ洗浄

タスクバーの**System Control**をクリックします。

1. **Manual ↓ Pump → PumpWash Explorer → A11, ON, ON, ON**
   **Execute**をクリックします。

## 15.2　システム洗浄

1. **Manual ↓ Pump → SystemWash → 40ml（explorer 10S）、75ml（explorer 100）**
   **Execute**をクリックします。

## 15.3　サンプルポンプ洗浄

1. サンプルチュービング**S1（使用したチューブ）**に、超純水の入った試験管を接続します。
2. サンプルポンプにチューブを接続します。
3. **Manual ↓ Flowpath → SampleValve**（使用したサンプルポート）
   **Execute**をクリックします。
4. **Manual ↓ Pump → SampleFlow → 2ml/min**
   **Execute**をクリックします。
   1〜4を繰り返し使用したチュービングを全て洗浄します。
5. **END**をクリックします。

## 15.4　フラクションラインの洗浄

＜Frac-950の場合＞

1. **Manual ↓ Pump → Flow → 2ml/min**
   **Execute**をクリックします。
2. **Manual ↓ Flowpath → OutletValve → FracF2**
   **Execute**をクリックします。
3. Accumulatorを使用した場合は、Accumulatorも洗浄します。
   **Manual ↓ Frac → AccumulatorWash → Strokes 5**
   **Execute**をクリックします。
4. Accumulatorが停止したら、次に素通りのフラクションラインも洗浄します。
   **Manual ↓ Flowpath → OutletValve → F3**
   **Execute**をクリックします。
5. 3分くらいしたら、**END**をクリックして終了します。



＜Frac-900の場合＞

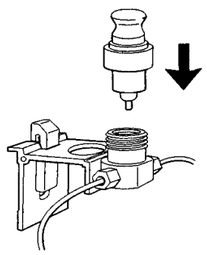
1. ポンプから送液します。
   **Manual ↓ Pump → Flow → 2ml/min**
   **Execute**をクリックします。
2. フラクションコレクターに試験管をセットします。
3. フラクションコレクターのラインを洗浄します。
   **Manual ↓ Frac → Fractionation-900 → FracSize 2ml**
   **Execute**をクリックします。
4. 試験管が交換したら、フラクションコレクターをストップします。
   **Manual ↓ Frac → FractionationStop-900**
   **Execute**をクリックします。
5. 素通りのフラクションラインも洗浄します。
   **Manual ↓ Flowpath → OutletValve → F3**
   **Execute**をクリックします。
6. 3分くらいしたら、**END**をクリックして終了します。

## 15.5　カラムの洗浄

超純水で洗浄します。2日以上使用しない場合は、カラムは20%エタノールに置換し、システムより外して保存します。

1. カラムのPressure limitの設定
   **Manual ↓ Alarms&Mon → Alarm_Pressure → High Alarm → （カラムの耐圧）**
   **Execute**をクリックします。
2. 洗浄するカラム選択バルブのポジションを選択します。
   **Manual → Flowpath → ColumnPosition → （洗浄するカラムのポジション）**
   **Execute**をクリックします。
3. 流速の設定
   **Manual ↓ Pump → Flow → （カラムの至適流速）**
   **Execute**をクリックします。
4. カラムのベットボリュームの3倍以上の超純水を流し、UV, Cond, Pressureカーブが安定したら
   **END**ボタンをクリックし終了します。

## 15.6　pH電極の保存



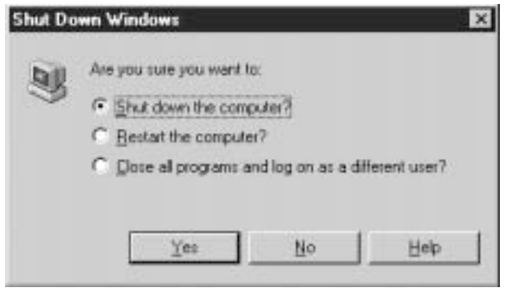
pH電極を取り外し、ダミー電極を接続します。

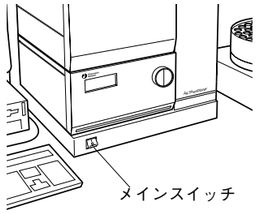
注：決してpH電極をつけたままにしないでください。使用後は必ずシステムから外し、飽和KClの溶液中で保存します。

## 15.7　システムの終了

1. タスクバーのUNICORN Main Menuをクリックします。
2. File　↓　Quit program
3. ウィンドウが表示された場合は、YESボタンをクリックします。
4. Leave Controlダイアログが表示されたら、OKボタンをクリックします。
5. Windowsのデスクトップが表示されます。
   オペレーションシステムを終了します。

   タスクバーより
   Start　↓　Shut Down




6. コンピュータ、ディスプレイ、プリンター、本体のメインスイッチをOFFにします。

注：コンピュータは、自動的に電源OFFになる機種もあります。

注：チャンバー内で使用の場合は、本体の電源は入れたままにします。



# 16. メンテナンス

## 16.1　システムの保存

システムを2日以上使用しない場合、システム全体を20%エタノールで置換します。20%エタノールに置換する場合は、必ず超純水でシステムを洗浄してから置換を行ってください。
塩が残った状態で20%エタノールを流すと塩が析出する恐れがあります。
また、pH電極は、pHフローセルから外し、ダミー電極をつけておいてください。

1. ポンプインレットチューブを20%エタノールのボトルに接続します。
2. タスクバーSystem Controlをクリックします。
   Manual　↓　Pump　→　PumpWash Explorer　→　A11, ON, ON, ON
   Executeをクリックします。
3. Manual　↓　Pump　→　SystemWash　→　40ml（explorer 10S）、75ml（explorer 100）
   Executeをクリックします。
4. サンプルポンプのS1チューブに20%エタノールのボトルに接続します。
   Manual　→　Pump　→　SampleFlow　→　2ml/min
   Executeをクリックします。
   5分間ほど送液し、ENDをクリックします。

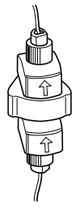
注：システムは、決してバッファーが入ったままで放置しないでください。

## 16.2　リンス液の交換

1. ポンプピストンの裏側を洗浄するリンス液は、週一回定期的に20%エタノールと交換します。

   注：リンス液が増えている場合は、ポンプシールからの液漏れの可能性があります。
   　　弊社技術サービスに連絡してください。
2. 交換した時は、ポンプから送液、リンス液が循環していることを確認してください。
3. 循環していない場合は、シリンジをリンスチューブに接続、リンス液を吸引します。
4. 循環しない場合、AポンプとBポンプの間のコネクターを外し、詰まりがないか確認します。詰まりがある場合、コネクターを超音波洗浄し、詰まりを除きます。

## 16.3　オンラインフィルター



ポンプのプレッシャー表示が通常より高くなった場合は、ミキサーとインジェクションバルブの間にあるオンラインフィルターの中のフィルターフリットを超音波洗浄します。
（2M NaOH使用）
　　フリット explorer 10S用　18-1120-94

100のシステムは、バックプレッシャーが高くなった場合、新しいフィルター(18-1027-11)と交換して下さい。

## 16.4　インレットフィルター

インレットフィルターが詰まると陰圧になり、エアーが発生しやすくなります。
詰まっている場合は、交換してください。

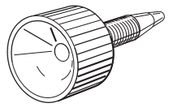
## 16.5　フラクションコレクター

＜Frac-900の場合のみ＞
ドライブスリーブ（19-6067-02）が劣化している場合は、交換します。

注：フラクションボールを回転したり、外す場合は必ずドライブスリーブを軽く後方に引いてボールから離してください。

←ドライブスリーブ

## 16.6　インジェクションフィルポート



インジェクションフィルポートから、液漏れする場合は、フィルポートにシリンジの針をさした状態で、フィルポートを指で軽く締めます。それでも、液漏れする場合はフィルポート先を交換（プラスチックスリーブ 18-1154-17）してください。

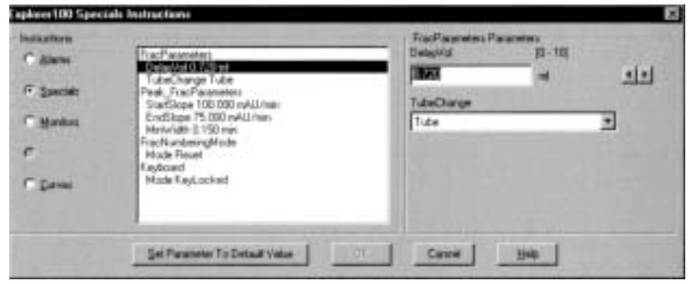
1. インジェクションフィルポートをインジェクションバルブから外します。
2. 新しいインジェクションフィルポートをインジェクションバルブに軽く接続します。
3. フィルポートにシリンジの針をさした状態で、フィルポートを指で軽く締めます。



# 17. システム設定

## 17.1　ディレイボリューム確認

1. タスクバーの**System Control**をクリックします。
2. **System　↓　Settings**




3. **Specials　→　FracParameters　→　DelayVol　→　0.39ml**
4. **OK**をクリックします。

**ディレイボリューム**

**＜Frac-950の場合＞**

**ÄKTAexplorer 10Sの場合**

Accumulator使用時

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径0.25mm（青） | 256 µl | — |
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 451 µl | 573 µl |

Accumulator 不使用時

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径0.25mm（青） | 105 µl | — |
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 301 µl | 423 µl |

**ÄKTAexplorer 100の場合**

Accumulator使用時

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 448 µl | 570 µl |
| 内径 0.75mm（グリーン） | 775 µl | 924 µl |
| 内径 1.0mm（ベージュ） | 1232 µl | 1418 µl |

Accumulator 不使用時

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 297 µl | 419 µl |
| 内径 0.75mm（グリーン） | 624 µl | 773 µl |
| 内径 1.0mm（ベージュ） | 1081 µl | 1267 µl |

**＜Frac-900の場合＞**

**ÄKTAexplorer 10Sの場合**

| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径0.25mm（青） | 105 µl | — |
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 301 µl | 423 µl |

**ÄKTAexplorer 100の場合**

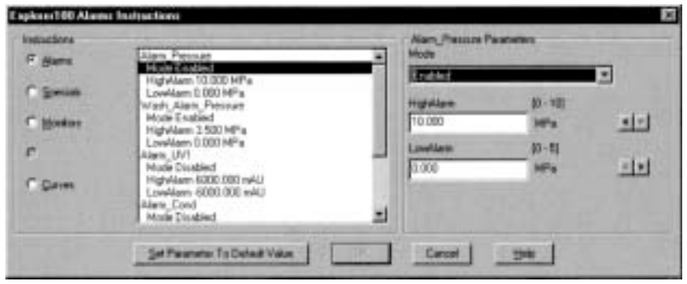
| チュービング | pH Cellなし | pHセルあり |
|---|---|---|
| 内径 0.5mm（オレンジ） | 297 µl | 419 µl |
| 内径 0.75mm（グリーン） | 624 µl | 773 µl |
| 内径 1.0mm（ベージュ） | 1081 µl | 1267 µl |

## 17.2　システムの耐圧設定

マニュアル操作の場合、システムの耐圧は10Sシステム25MPa、Explorer 100システムは10MPaになります。カラムに送液したり、スーパーループを使用する場合は、システムの耐圧設定を下げてください。

1. タスクバーの**System Control**をクリックします。

2. **System　↓　Settings**




3. **Alarms　→　Alarm Pressure　→　HighAlarm　4MPa**
（例：Superloop 50 ml）

4. **OK**をクリックします。

## 17.3　コンダクティビティモニターのCond%表示

コンダクティビティモニターのCond%（バッファーのB%）を表示させたい場合は、開始バッファーと溶出バッファーのコンダクティビティ（電気伝導度）を0%と100%として登録します。

1. タスクバーの**System Control**をクリックします。

2. **System　↓　Settings**

3. **Monitors　→　SetCondScale0%　→　開始バッファー※1（0%B）の電気伝導度（mS/cm）**

4. **Monitors　→　SetCondScale100%　→　溶出バッファー※2（100%B）の電気伝導度（mS/cm）**

5. **OK**をクリックします。

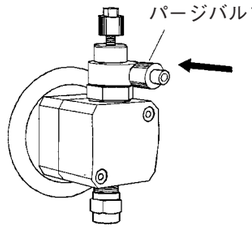
6. 初期設定にもどしたい場合は、**Set Parameter To Default Value**をクリックします。

※1：電気伝導度が低い方のバッファー
　例）疎水性相互作用、逆相の場合は溶出液
※2：電気伝導度が高い方のバッファー
　例）疎水性相互作用、逆相の場合は開始液



# 18. キャリブレーション

## 18.1　圧力センサー




ポンプ停止時、圧力センサーの表示が高い時に行います。（FR-902使用時に0.2MPa以上の場合）

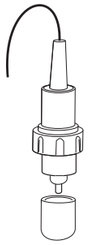
1. Aポンプのパージバルブ2ヶ所を半時計方向に半回転ゆるめます。

2. **System　↓　Calibrate　→　Monitor　→　P900Press**

3. **Start Calibrate**ボタンをクリックします。

4. キャリブレーションが終了したら緩めたパージバルブを締めます。

## 18.2　pH電極キャリブレーション



pHモニターを使用する前に行います。コールドチャンバー等で使用する場合は、標準液も温度が安定してから行います。

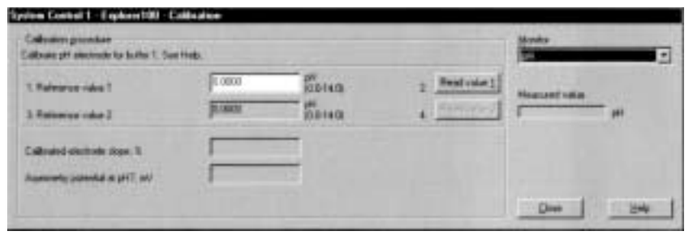
1. pH電極の電極カバーを外します。

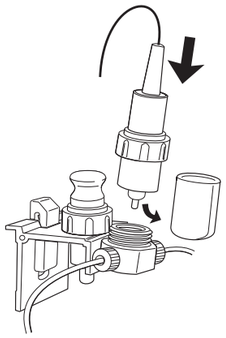
> 注：この時カバー内の飽和KClがこぼれない様に、電極の代りにダミー電極を付けておきます。

2. 電極表面を洗瓶にて超純水で洗浄後、キムワイプで軽く拭き取ります。

3. pH7.0標準液に電極をつけます。

4. **System　↓　Calibrate　→　Monitor　→　pH Reference Value1**に6.86（25℃）と入力します。





5. **Measured value**のpH値が安定したら、**Read Value1**ボタンをクリックします。
6. 電極洗浄後、同様にpH4.01（25℃）（またはpH9.18）の標準液に電極をつけます。
7. **Reference Value2**に4.01（25℃）（またはpH9.18）と入力します。
8. **Measured value**のpH値が安定したら、**Read Value2**ボタンをクリックします。

   注：標準液は必ず使用温度で安定後、その温度でのpH値でキャリブレーションしてください。

9. pHフローセルにpH電極をセットします。

   注：pHフローセルにエアが入らないように注意してください。



# 19. ファイル管理（Main menu）

## 19.1　新規フォルダーの作成

ユーザーのフォルダー内に新規にフォルダーを作成することができます。サンプル毎や、日付でデータを整理することができます。

1. タスクバーの**UNICORN Main Menu**をクリックします。
2. **Methods**または**Results**で、フォルダを作成したいウィンドウを選択します。
3. **マウスの右ボタン**をクリックし、メニューより**New Folder**を選択します。**Create New Folder**ダイアログが表示されます。
4. 新規フォルダー名を入力し**OK**をクリックします。

## 19.2　ファイルを開く、メソッドの実行

### ・ファイルを開く

1. ファイルを開くには、**Methods**または**Results**のウィンドウのファイルをクリックし、**マウスの右ボタン**をクリックします。
2. メニューより**Open**を選択します。

または、ファイル名をダブルクリックします。

### ・メソッドの実行

1. **Methods**ウィンドウより、実行したいファイルをクリックし、**マウスの右ボタン**をクリックします。
2. メニューより**Run**を選択します。

## 19.3　ウインドウ表示

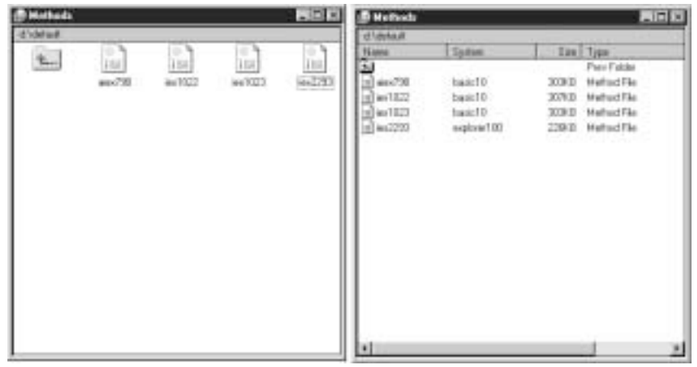
**Methods**または**Results**のウィンドウで、**マウスの右ボタン**をクリックします。

・View mode

1. メニューより**View**を選択します。

2. メニューより希望する表示を選択します。

| | |
|---|---|
| **Details** | ファイルの作成日やファイルサイズなどを表示 |
| **List** | ファイル名（アイコン）のみの表示 |
| **Large Icons** | 大きなアイコン表示 |
| **Small Icons** | 小さいアイコン表示 |



・ファイルのソート

ファイルを並べ換えることができます。

1. メニューより**Sort**を選択します。

2. メニューより希望するソートを選択します。

| | |
|---|---|
| **Name** | ファイル名をアルファベット順に表示 |
| **System** | システムのアルファベット順に表示（Methodsウィンドウのみ） |
| **Size** | ファイルサイズ順に表示 |
| **Type** | ファイルの拡張子のタイプのアルファベット順に表示 |
| **Modified** | 最終ファイル修正日順 |
| **Created** | ファイル作成日順 |



・Filter

表示するファイルをファイル名などで制限することができます。

1. **マウスの右ボタン**をクリックし、メニューより**Filter**を選択します。

2. ファイル名を入力します。
入力例：

| | |
|---|---|
| **iex** | ファイル名iexを表示 |
| **iex*** | iexで始まるファイルを表示 |
| ***iex** | ファイル名の最後がiexのファイルを表示 |
| **?iex** | 4文字でファイルの最後がiexのファイルを表示 |

3. Filterされている場合は、タイトルバーに（例：filtered iex*）表示されます。

4. Filterを解除するには、**Filter**を選択します。
**Default**をクリックし、**OK**をクリックします。

## 19.4　ファイルの検索

1. **マウスの右ボタン**をクリックし、メニューより**Find**を選択します。

2. **Find files**ダイアログより、**Named**で検索するファイル名を入力します。ワイルドカード＊も使用できます。

3. 検索するものを制限できます。
・**Type**でファイルタイプを選択してください。
Methodsウィンドウ ；All, Folders, Method files, MethodQueue files
Resultsウィンドウ ；All, Folders, Result files, Scouting files

・**Date**をクリックし、検索させる日付の制限を指定し、**OK**をクリックします。

4. **Search**クリックします。検索結果が**Found folders and files**ボックスに表示されます。

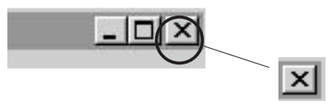
5. リストよりファイル名をダブルクリックすると、**UNICORN Main menu**のウィンドウに検索したファイルがハイライトします。

6. ファイル名を選択せずに、**Close** をクリックすると検索を中断し終了します。

## 19.5 フロッピーディスクのフォーマット

フロッピーディスクは2HDを使用します。フォーマットはDOS-Vフォーマット（1.44MB）で行います。

1. フロッピーディスクを**ドライブA**に挿入します。
2. Windowsのデスクトップより、**My Computer**のアイコンをダブルクリックします。
3. **3 ½ Floppy A**のアイコンにマウスのポインターを移動し、**マウスの右ボタン**をクリックします。
4. メニューより**Format...**を選択します。
5. **Start**ボタンをクリックします。
6. **OK**ボタンをクリックします。
7. **Format complete**と表示されたら、**OK**ボタンをクリックします。
8. **Close**ボタンをクリックします。
9. **My Computer**のウィンドウの左肩の**X**ボタンをクリックしウィンドウを閉じます。





## 19.6 データのバックアップ（Copy to external）

1. タスクバーの**UNICORN Main Menu**をクリックします。**Methods**または**Results**ウィンドウでバックアップしたいファイルにカーソルを移動し、**マウスの右ボタン**をクリックします。

2. メニューより**Copy to external**を選択します。

3. **Copy to:**で**3 ½ Floppy（A:）** を選択し、**Save**ボタンをクリックします。

> 注：**Copy to external**でバックアップしたResultファイルは自動的に**zipファイル**（圧縮）になります。zipファイル（圧縮）は自動的に**Copy from external**で解凍されます。

## 19.7 バックアップしたデータをハードディスクにコピー（Copy from external）

1. タスクバーの**UNICORN Main Menu**をクリックします。**Methods**または**Results**ウィンドウでバックアップしたいファイルを保存するフォルダーを選択します。

2. ウィンドウの空いている所にカーソルを移動し、**マウスの右ボタン**をクリックします。

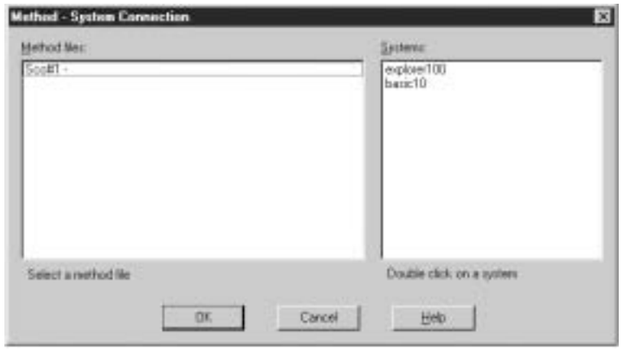
3. メニューより**Copy from external**を選択します。

3. **Copy from:**で**3 ½ Floppy A**を選択します。

4. フロッピーディスクの中に保存された、データのリストが表示されます。保存したいファイルを選択し、**OK**ボタンをクリックします。

5. Resultファイルを選択した場合はファイル名を自動的にResultsウィンドウに保存します。

6. Methodファイルを選択した場合は**Method-System Connection**ダイアログが表示されます。




7. Method fileでファイル名をクリックしてハイライト指定し、**Systems**で**system 1**をダブルクリックします。

8. **OK**をクリックします。

> 注：**Copy from external**ではzipファイル（圧縮）も圧縮してないファイルもコピーできます。**Copy**ではzipファイル（圧縮）をコピーできません。

## 19.8　ファイルの削除

不要なファイルは削除してください。

1. タスクバーの**UNICORN Main Menu**をクリックします。**Methods**または**Results**ウィンドウで削除したいファイルを選択します。

2. 複数のファイルを一度に削除したい場合は、キーボードの**Ctrキー**を押しながら、ファイルをクリックしてください。

2. 選択したファイルで**マウスの右ボタン**をクリックし、メニューより**Delete**を選択します。

3. 確認するダイアログが表示されます。削除していいか確認し**OK**ボタンをクリックします。

## 19.9　ファイル名の変更（Rename）

1. タスクバーの**UNICORN Main Menu**をクリックします。**Methods**または**Results**ウィンドウで、ファイル名を変更したいファイルを選択します。

2. ファイルのアイコンにポインターを合わせ、**マウスの右ボタン**をクリックします。メニューより、**Rename**を選択します。

3. 新しいファイル名を入力し、**OK**をクリックします。

## 19.10　プリンタ設定

プリンタドライバーの変更や、用紙設定（縦書き、横書き）の設定ができます。

1. タスクバーの**UNICORN Main menu**をクリックします。メニューバーより
**File　↓　Printer Setup**

2. 設定を変更します。



# 20. 応用

## 20.1　サンプルの添加

ÄKTAexplorer 10S / 100は、用途、サンプル容量に応じたサンプル添加ができます。
サンプル添加は、4つの方法があります。

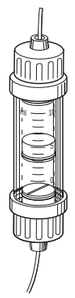
・シリンジを用いたマニュアル充填、サンプルループ使用
・サンプルポンプによる自動充填、サンプルループ使用
・スーパーループ使用
・グラジエントポンプによる大容量添加

サンプル容量に応じた手法と、**Wizard**で選択する**Sample Injection Technique**を下に示します。

| サンプル添加方法 | 添加する容量 | Sample Injection Technique |
|---|---|---|
| サンプルループマニュアル充填 | 0～2ml | Manual |
| サンプルループ自動充填 | 0.1～2ml | SamplePump Loop Filling |
| スーパーループ自動充填 | 1～150ml | SamplePump Loop Filling |
| サンプルループからカラムへのダイレクトローディング | ～20L | SamplePump Direct Loading |
| グラジエントポンプ※ | ＞10ml | SystemPump Direct Loading※ |

> 注：アイソクラティック（例：ゲルろ過）やBufferPrepを使用する場合はグラジエントポンプの使用は、おすすめいたしません。

### 20.1.1　スーパーループによるサンプル添加

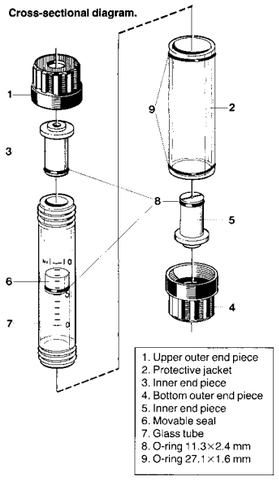


大量のサンプルを添加する場合は、スーパーループ（オプション）を使用します。スーパーループの容量は、10、50、150mlがあります。

| | |
|---|---|
| 10ml | 18-1113-81 |
| 50ml | 18-1113-82 |
| 150ml | 18-1023-85 |

スーパーループを使用すると、再現性良く、高い回収率が得られます。サンプルは可動シールとエンドピースの間に充填し、バッファーとは接触しないので、希釈されません。また、スーパーループ内のサンプルは一度に全部、または何回かに分けてカラムに添加することができます。スーパーループを用いて、スカウティング時のサンプル自動添加もできます。
スーパーループにサンプルを充填する場合はシリンジを用いマニュアル充填します。
**Injection technique**は**Manual**を選択します。

### 20.1.1.1　スーパーループ準備




1. スーパーループを組み立てます。

   注：組み立てる時は各パーツをMilli-Q水等で濡らした状態で組み立てると、スムーズに組み立てることができます。

2. エンドピースにUnion 1/16" female/M6 male,PEEK（18-1112-57　6個入り）を付けます。

3. エンドピースにFingertight Connector,1/16"（18-1112-48　10個入り）でPEEKチューブ（スーパーループ付属の短い方）を接続します。

4. ガラスチューブ（0mlの目盛が下）の上※から、可動シールとUpper Chamber側エンドピース（PEEKチューブの長い方）を挿入します。

   注：スーパーループ150 mlは可動シールをガラスチューブ（0目盛の方）の下から入れて下さい。可動シールを机において、上からガラスチューブをかぶせるようにすると入りやすいです。

   注：可動シールはOリングの付いている方を下（0mlの目盛）に向けてください。

5. Bottom Chamberから開始バッファーを満たし、Bottom Chamber側エンドピース（PEEKチューブの短い方）を挿入します。

6. 黒いアウターエンドピースとプロテクティブジャケット（プラスティックの筒）を取り付けます。

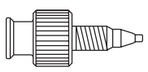
7. インジェクションバルブにスーパーループを接続し、クランプで固定します。
   Upper Chamber側　→　インジェクションバルブ**ポート6**
   Bottom Chamber側　→　インジェクションバルブ**ポート2**

8. ポンプから開始バッファーを送液し、スーパーループ内のエアーを抜きます。
   タスクバーの**System Control**をクリックします。

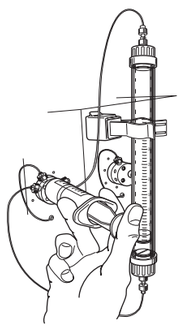
9. スーパーループの耐圧の設定をします。
   **Manual ↓ Alarms&Mon → Alarm_Pressure → High Alarm →（スーパーループの耐圧）**
   **Execute**をクリックします。

   | | |
   |---|---|
   | 注：スーパーループ10、50ml | 4MPa |
   | スーパーループ150ml | 2MPa |

10. インジェクションバルブのポジションを**Inject**にします。
    **Manual ↓ Flowpath → InjectionValve → Inject**
    **Execute**をクリックします。



11. ポンプから開始バッファーを送液します。
    **Manual ↓ Pump → Flow → 5ml/min**
    **Execute**をクリックします。



12. 可動シールがスーパーループの下（0mlの目盛）に到達したら**END**をクリックします。

13. シリンジにUnion Luer female/1/16”male,PEEK（18-1112-51 2個入り）を付け、開始バッファーを満たします。

14. インジェクションバルブの**ポート3**にシリンジをねじ込みます。

15. シリンジから開始バッファー（約5ml）をスーパーループに注入します。

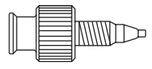
16. スーパーループの上下を逆さにしてクランプに固定します。

17. 9～12を実行します。

18. エアーが抜けるまで、上記の操作を繰り返します。



### 20.1.1.2　スーパーループへのサンプルの充填



1. インジェクションバルブのポジションが**LOAD**であることを確認します。

2. シリンジにUnion Luer female/1/16”male,PEEK（18-1112-51 2個入り）を付け、サンプルを満たします。

   注：シリンジはルアーロックタイプのもの（シリンジの先がねじ式）を使用することをお勧めします。

3. インジェクションバルブの**ポート3**にシリンジをねじ込みます。

4. シリンジからサンプルをスーパーループに注入します。

5. シリンジはインジェクションバルブに接続したままにしておきます。

## 20.1.2　グラジエントポンプを用いた大量サンプルの添加

グラジエントポンプを用いて大量のサンプルを直接カラムに添加することも可能です。

注：アイソクラティック手法（ゲルろ過クロマトグラフィーなど）でサンプルを添加する場合は、グラジエントポンプを使用しないでください。BufferPrepを使用する場合もグラジエントポンプは使用できません。

注：グラジエントポンプをサンプル注入に使用する場合は、オンラインフィルターを、使用後毎回洗浄してください。

### 20.1.2.1　グラジエントポンプの準備

1. サンプルを0.45 μmのフィルターでろ過してください。

2. バッファー選択バルブにインレットチューブを追加します。
   バッファーバルブの**ポート8（A18）**※にインレットチューブを接続します。

   注：HICでSystem Pump Dilrect Loadingを行なう場合
   サンプルインレットは**B2**を使用します。使用するバファーは、Aポンプ：溶出液、Bポンプ：開始液のように接続します。グラジェント溶出は100%B-0%Bで行います。

3. インレットチューブ**A18**をサンプルの入った容器に接続します。

4. インレットチューブ**A18**にサンプルを満たします。
   **Manual ↓ Flowpath → BufferValveA1 → A18**
   **Execute**をクリックします。

5. Aポンプのヘッドにパージチュービングを接続し、パージチュービングのついた30mlのシリンジを接続します。

6. 接続した各ポンプヘッドのパージバルブを反時計回りに半回転し、シリンジで吸引します。

   注：ゆっくり引いてください！急激に吸引すると、陰圧となり気泡が発生します。

7. サンプルがバッファー選択バルブに到達したら、
   **Manual ↓ Flowpath → BufferValveA1 → A11**
   **Execute**をクリックします。

8. **A11**のラインをパージします。
   開始バッファーがシリンジの中に入り始めたら、そのまま数ml吸引し、パージバルブを閉めます。

### 20.1.2.2　サンプル添加

タスクバーの**Method Editor**をクリックします。

1. **Injection technique**は**System Pump Direct Loading**を使用します。
2. **Injection Volume**にカラムに添加するサンプルボリュームを入力します。バッファーバルブに至るインレットチューブにサンプルが充填されていない場合（＝バッファーで満たされている場合）は、入力値にインレットチューブのボリューム（2.5ml）※を加えてください。

※explorer 100の場合
内径2.9mmチューブ使用時：＋8.3ml
内径1.0mmチューブ使用時：＋1ml

注：メソッドスカウティングを行う場合は、このボリュームはスカウティングの初回実行時のみ入力します。

3. **Sample Inlet**を選択します。**Pump A Inlet A2**又はバッファーバルブ**A18**（A12-A18）を選択します。
4. **Variables**のページで**Show datails**をマークし、**Wash Out Unbound Sample**でカラムに吸着しないサンプルを洗浄するバッファーボリュームを入力します。使用する**ミキサーボリュームの5倍+15ml+カラム洗浄に必要なボリューム**を入力します。この値はカラム体積単位（CV）で入力します。

### 20.1.2.3　グラジエントポンプの洗浄

サンプル添加にグラジエントポンプを使用した後は、速やかにポンプを洗浄してください。

1. インレットチューブ**A18**又は**A2**（サンプル添加に使用したチューブ）に1M NaOHを接続します。
2. タスクバーの**System Control**をクリックします。
3. **Manual → Flowpath → PumpAInlet → A2**
又は
**Manual → Flowpath → BufferValve A1 → A18（使用したチューブ）**を選択し、**Execute**をクリックします。
4. **Manual → Pump → Flow → 5ml/min**
**Execute**をクリックします。
5. 30分以上流し、UV,コンダクティビティのカーブが安定したら、**END**をクリックします。
6. 超純水でシステムを洗浄します。（システム洗浄参照）



## 20.2　カラムリストの追加

カラムリストにないカラム（自分でパッキングしたカラムなど）を、リストに追加することができます。

1. タスクバーの**Method Editor**をクリックします。
2. メニューバーの**Edit → Column List**をクリックします。
**Column List**ダイアログが表示されます。

3. **New**をクリックし、**Edit column**ダイアログを表示します。




4. テキストボックスより、パラメータの**Valve**をダブルクリックして値を入力し**Replace**をクリックします。

注：**Typical peak width at base**は、**Average time**と**Peak fractionation**の**Min Width**の入力に関係します。

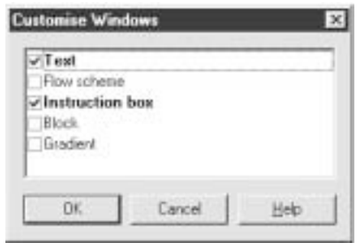
注：すでに入力されているカラムリストを参照して入力してください。

5. **Save As**をクリックしカラム名を入力します。
**Save as global**ボックスをチェックすると、全てのユーザーが使用できます。
自分しか使用しない場合は**Save as global**ボックスをチェックしないでください。
6. **Save As**をクリックしカラムリストに追加します。

## 20.3　メソッドテンプレート

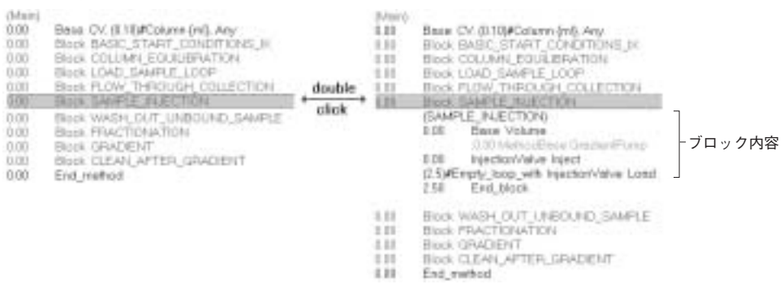
### 20.3.1　Text Instructionエディターよりメソッドの変更

1. ツールバーの**Text Instructions**のアイコンをクリックします。
2. ツールバーの**Windows**アイコンをクリックします。




3. **Text, Instruction box**をチェックし、**OK**をクリックします。

4. ブロックが表示されます。ブロックをダブルクリックすると、ブロックの内容が表示されます。






#### 20.3.1.1　コマンドの追加

1. **Text**ウィンドウでコマンドを追加したいブロックをダブルクリックします。
2. コマンドを追加したい行をクリックしてハイライト指定します。
3. **Instruction box**より
   **Breakpoint**と**Instructions**と**Parameters**を選択し、**Insert**をクリックします。

#### 20.3.1.2　コマンドの変更

1. **Text**ウインドウでコマンドを変更したいブロックをダブルクリックします。
2. コマンドを変更したい行をクリックしてハイライト指定します。
3. **Instruction box**より
   **Breakpoint**と**Instructions**と**Parameters**を選択し、**Change**または**Replace**をクリックします。

注：**Change**は変更したコマンドに続く行も**Breakpoint**が変更されます。

***Change***

**Replace**は**Breakpoint**が変更されません。

***Replace***

#### 20.3.1.3　コマンドの削除

1. **Text**ウィンドウでコマンドを削除したいブロックをダブルクリックします。
2. コマンドを削除したい行をクリックしてハイライト指定します。
3. **Instruction box**より
   **Delete**をクリックします。

GE Healthcare

# 安全上のご注意

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

**警告** 誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

**注意** 誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

## 必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

図記号の意味は次の通りです。

禁止 ⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

## 警告

**電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない**

禁止

火災・感電の原因になります。

**電源コード・電源プラグを傷つけない**

禁止

●加工しない ●束ねない ●ねじらない
●折らない ●物をのせない ●加熱しない
●無理に曲げない

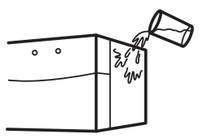
破損して火災・感電の原因になります。

**電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む**

根元まで差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

**本体を水につけたり、水をかけたりしない**



禁止

ショート・感電の原因になります。

**使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない**

禁止

高温部に触れ、やけどの原因になります。

**同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない**

禁止

故障・火災・感電の原因になります。

**電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない**

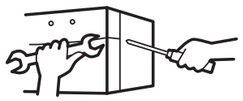
禁止

火災・感電・故障の原因になります。

**修理・分解・改造はしない**

禁止

火災・感電の原因になります。



**取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する**

指定の規格

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

**電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない**

禁止

感電・ショート・発火の原因になります。

**異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く**

プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

**同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない**

禁止

故障・火災・感電の原因になります。

## 注意

**設置時は、次のような場所には置かない**

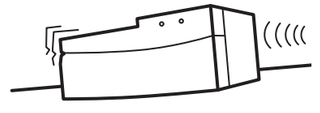
禁止

●不安定な場所 ●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所 ●風雨のあたる場所
●熱器具の近く ●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

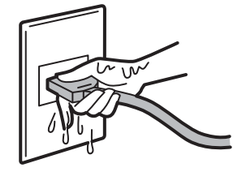
**水平で丈夫な場所に設置する**

水平



**ぬれた手で電源プラグを抜き差ししない**

禁止



感電の原因になります。

**電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く**

プラグを持つ

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

## 低温室で使用する場合の注意

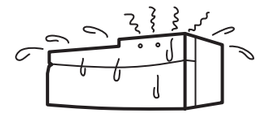
**装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく**

電源を入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

**装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）**

電源を入れない



感電・漏電火災の原因になります。


弊社製品についてのお問合せ （バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

## ■機器メンテナンス・保守契約・修理のお問合せ

**● 東日本技術サービス部**

TEL：03-5331-9315
FAX：03-5331-9349

**● 西日本技術サービス部**

TEL：06-6305-4707
FAX：06-6305-3599

## ■テクニカルのお問合せ（バイオダイレクトライン）

**● TEL：03-5331-9336**

**応答メッセージが聞こえましたら、下記の番号を押してください。**

クロマトグラフィー関連製品 ：1
ビアコア関連製品 ：2
電気泳動関連製品 ：3
その他製品 ：4

**● FAX：03-5331-9370**

**● e-mail：Tech-JP@ge.com**

※ アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。
※ 主な製品マニュアルや製品 Q&A、ユーザートレーニング・Science Program の日程等は弊社 Web サイトで公開していますのであわせてご活用ください。

www.gelifesciences.co.jp

e-mailで最新情報をお届けしています。お申込みは上記Webサイト右上の「メール会員登録」から。

©2011 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社　本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2008認証取得

取扱店